

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

**EFEITO DO *INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR-I* (IGF-I) RECOMBINANTE
SOBRE A SECREÇÃO ESPONTÂNEA DE HORMÔNIO DE CRESCIMENTO,
SECREÇÃO ESTIMULADA DE TSH E EXCREÇÃO URINÁRIA DE CÁLCIO
E NITROGÊNIO, EM UMA PACIENTE COM DELEÇÃO PARCIAL DO
GENE DO RECEPTOR DO IGF-I**

CURITIBA

1997

JULIENNE ANGELA RAMIRES DE CARVALHO

**EFEITO DO *INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR-I* (IGF-I) RECOMBINANTE
SOBRE A SECREÇÃO ESPONTÂNEA DE HORMÔNIO DE CRESCIMENTO,
SECREÇÃO ESTIMULADA DE TSH E EXCREÇÃO URINÁRIA DE CÁLCIO
E NITROGÊNIO, EM UMA PACIENTE COM DELEÇÃO PARCIAL DO
GENE DO RECEPTOR DO IGF-I**

**Dissertação apresentada como requisito
parcial à obtenção de grau de Mestre. Curso
de Pós-Graduação em Pediatria, Setor de
Ciências da Saúde, Universidade Federal do
Paraná**

Orientador: Prof. Luiz de Lacerda Filho

CURITIBA

1997

*Aos meus pais, Angelo e Luzia,
que me ensinaram a sonhar e a lutar por meus ideais.*

Ao Fábio, pelo amor e serenidade nos momentos difíceis.

AGRADECIMENTOS

Meu agradecimento especial ao **Professor Luiz de Lacerda Filho**, pelo incentivo, dedicação e amizade durante esta jornada.

Ao **Prof. Romolo Sandrini Neto**, pela dedicação ao ensino da Endocrinologia Pediátrica, pelo compromisso com a investigação e pelo apoio na realização deste projeto.

Ao **Prof. Izrail Cat**, pela formação profissional, pela dedicação ao Curso de Pós-Graduação e pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao **Dr. Mitsuro Miyaki**, chefe do Departamento de Pediatria, pelos ensinamentos em Pediatria e pelo apoio para a execução deste projeto.

Ao **Dr. Louis E. Underwood**, da Universidade da Carolina do Norte, pelo auxílio na montagem do protocolo e pela gentileza na realização das dosagens hormonais.

Ao **Dr. Derek LeRoith** e ao **Dr. Haim Werner**, do National Institutes of Health, pela realização dos estudos genéticos.

Ao **Dr. Saul Malozowski**, do Food and Drug Administration, pelos contatos iniciais para realização dos estudos genéticos.

À **Dra. Patrícia H. Gallego**, pela ajuda inestimável na coleta do material.

À **Dra. Margaret Cristina Boguszewski**, pela ajuda na análise das dosagens de hormônio de crescimento.

À **Nutricionista Tania Maria Kulcvycki Padilha**, pela atenciosa orientação e supervisão nutricional.

Aos **Professores e Médicos do Departamento de Pediatria**, pela formação profissional.

Aos **Professores do Curso de Pós-Graduação em Pediatria**, pelo empenho e amizade.

À Professora Martha Garcia Gomensoro de Sánchez, pela orientação em Metodologia Científica e incentivo constante.

Ao Professor Juarez Gabardo, pela dedicação na realização da análise estatística dos dados.

À Equipe do Serviço de Endocrinologia Pediátrica: Anita Kochla Santos, Dr. Bonald Cavalcanti Figueiredo, Dra. Carla Demeterco, Dra. Claudete C. Silva, Dr. Fabiano Sandrini, Francisca de Lara, Dra. Gabriela C. Kraemer, Dr. Genoir Simoni, Jandyra Kondera, Leonor Trevizan, Dra. Mariangela Sampaio, Dr. Mauro Scharf Pinto, Dra. Rosana Marques, Dra. Rose Marie Müller e Dra. Suzana Nesi França.

Aos Colegas do Mestrado em Pediatria, pela amizade e incentivo.

À Professora Antônia Schwinden, pela atenciosa revisão.

À Léia Rachel Castellar, pela editoração.

Aos Funcionários da Pediatria e do 4º andar central do Hospital de Clínicas, pela colaboração.

À Pharmacia-Upjhon, pela doação do IGF-I recombinante.

À J.T.L e sua família, pela colaboração na realização deste trabalho.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 OBJETIVOS.....	3
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 SÍNDROME DO CROMOSSOMA 15 EM ANEL	4
2.1.1 Cromossoma 15 (crom.15)	4
2.1.2 Cromossoma em Anel	4
2.1.3 Características Clínicas	4
2.1.4 Crom. 15 em Anel e Crescimento.....	6
2.2 <i>INSULIN-LIKE GROWTH FACTORS</i> (IGF).....	10
2.2.1 Aspectos Históricos.....	10
2.2.2 Regulação da Produção de IGF	12
2.2.2.1 Parácrina	12
2.2.2.2 Endócrina.....	14
2.2.3 Receptores de IGF.....	19
2.2.4 Proteínas Ligadoras de IGF (IGFBP).....	21
2.2.5 Efeitos da Administração de RhIGF-I em Humanos	25
2.2.5.1 Indivíduos normais.....	25
2.2.5.2 Indivíduos catabólicos.....	27
2.2.5.3 Pacientes diabéticos	28
2.2.5.4 Síndrome de Laron.....	28

2.2.5.5	Efeitos adversos do uso de RhIGF-I	30
2.2.6	Farmacocinética do RhIGF-I	30
3	PACIENTE E MÉTODOS	32
3.1	PACIENTE	32
3.2	MÉTODOS	36
3.2.1	Fase A.....	39
3.2.2	Fase B.....	39
3.2.3	Dieta	40
3.2.4	Coleta do Material.....	42
3.2.5	Dosagens Laboratoriais	42
3.2.6	Monitorização da Glicemia	44
3.2.7	Medicação (RhIGF-I).....	44
3.2.8	Tratamento Estatístico.....	44
4	RESULTADOS	45
4.1	HORMÔNIO DE CRESCIMENTO.....	45
4.2	TSH.....	45
4.3	IGF-I, IGFBP-2 E IGFBP-3	47
4.4	Ca E N URINÁRIOS.....	48
4.5	GLICOSE.....	50
4.6	SINAIS E SINTOMAS ADVERSOS	50
5	DISCUSSÃO	51
5.1	HORMÔNIO DE CRESCIMENTO.....	51
5.2	TSH.....	53
5.3	IGF-I, IGFBP-2 E IGFBP-3	53
5.4	Ca E N URINÁRIOS.....	55
5.5	GLICOSE.....	56
6	CONCLUSÕES	57
7	COMENTÁRIOS E PROJEÇÕES	58

ANEXO 1 - APROVAÇÃO DO PROTOCOLO PELA COMISSÃO DE ÉTICA DO HOSPITAL DE CLÍNICAS	59
ANEXO 2 - CONSENTIMENTO POR ESCRITO DOS PAIS.....	61
ANEXO 3 - MODELO DE FICHA DE CONTROLE DIETÉTICO EMPREGADA	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

LISTA DE TABELAS

1	IDADE CRONOLÓGICA (IC), IDADE ÓSSEA (IO) E ESCORE-Z DA ESTATURA (H-SDS)	36
2	SECREÇÃO PULSÁTIL DE HC DURANTE 12 HORAS NAS FASES A E B	45
3	VALORES DE TSH NO TESTE DO TRH.....	46
4	VALORES DE IGF-I, IGFBP-2 E IGFBP-3 NAS FASES A E B	48
5	VOLUME URINÁRIO DE 24 HORAS, INGESTA DE N, EXCREÇÃO DE CREATININA, N E Ca NA FASE B, ANTES DO USO DE RhIGF-I	48
6	VOLUME URINÁRIO DE 24 HORAS, INGESTA DE N, EXCREÇÃO DE CREATININA, N E Ca NA FASE B, DURANTE O USO DE RhIGF-I	49
7	VALORES DE GLICEMIA DURANTE A ADMINISTRAÇÃO DE RhIGF-I	50

LISTA DE FIGURAS

1 FOTOS DA PACIENTE NA ÉPOCA DA REALIZAÇÃO DO ESTUDO	33
2 CARIÓTIPO DE ALTA RESOLUÇÃO	34
3 ANÁLISE DO DNA DO RECEPTOR DE IGF-I POR SOUTHERN BLOT	35
4 ANÁLISE DO RNA DO RECEPTOR DE IGF-I POR NORTHERN BLOT	35
5 GRÁFICO DE CRESCIMENTO	37
6 GRÁFICO DA VELOCIDADE DE CRESCIMENTO.....	38
7 GRÁFICO DO ESCORE-Z DA VELOCIDADE DE CRESCIMENTO	38
8 ESQUEMATIZAÇÃO DO PROTOCOLO	40
9 GRÁFICO DA SECREÇÃO ESPONTÂNEA DE HC	46
10 GRÁFICO DOS VALORES DE TSH NO TESTE DO TRH	47
11 GRÁFICO DA EXCREÇÃO URINÁRIA DE CÁLCIO	49
12 GRÁFICO DA EXCREÇÃO URINÁRIA DE NITROGÊNIO	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μCi	- microcurie
μg	- microgramas
ACTH	- hormônio adrenocorticotrófico
ALS	- subunidade ácido-lábil
AMPC	- adenosina monofosfato cíclica
Arg	- arginina
AUC	- área sob a curva
BP	- proteínas ligadoras
Ca	- cálcio
cal	- calorias
cm	- centímetros
Crom.15	- cromossoma 15
CV	- coeficiente de variação
dl	- decilitro
DNA	- ácido desoxirribonucleico
EV	- endovenosa
FC	- formação de colônias
FFA	- ácidos graxos livres
FSH	- hormônio folículo-estimulante
G&P	- Greulich & Pyle
g	- gramas
GHRH	- hormônio liberador de hormônio de crescimento
H-SDS	- escore-Z da estatura
h	- hora
HbA1c	- hemoglobina glicosilada
HC	- hormônio de crescimento
HV-SDS	- escore-Z da velocidade de crescimento
IGF-I R1	- receptor de IGF-I tipo 1
IGF-I	- insulin-like growth factor-I
IGF-II	- insulin-like growth factor-II

IGF	- insulin-like growth factors
IGFBP	- proteínas ligadoras de IGFs
KD	- quilodaltons
Kg	- quilograma
L	- litro
LH	- hormônio luteinizante
Lys	- lisina
mg	- miligramas
ml	- mililitros
Mr	- molecular ratio
MSA	- atividade estimuladora da multiplicação
N	- nitrogênio
ng	- nanogramas
NSILA	- atividade like-insulina não suprimível
pH	- potencial hidrogênio iônico
QI	- quociente de inteligência
r15Crom	- cromossoma 15 em anel
RhGH	- hormônio de crescimento recombinante humano
RhIGF-I	- insuloin-like growth factor-I recombinante humano
RIE	- radioimunoensaio
RNAm	- ácido ribonucleico mensageiro
RX	- raio-X
SC	- subcutânea
SFA	- atividade de fator de sulfatação
SRS	- síndrome de Russell-Silver
SS	- somatostatina
T3	- triiodotironina
T4	- tiroxina
TRH	- hormônio liberador de TSH
TSH	- hormônio estimulador da tireóide
VC	- velocidade de crescimento
ViC	- viabilidade celular

RESUMO

O objetivo deste estudo foi testar a hipótese de resistência à ação do IGF-I em uma paciente com cromossoma 15 em anel e deleção parcial do gene do receptor de IGF-I (IGF-I R1). A paciente nasceu de gestação normal, com peso de 2,07 Kg e talhe de 42 cm. Aos 5,1 anos apresentava: altura, 87,2 cm (H-SDS, -4,3); peso, 11,1 Kg (4 Kg < 3º percentil); face triangular e assimétrica; palato ogivóide; orelhas proeminentes; manchas café com leite, retardo mental e idade óssea (IO) de 30 meses (Greulich & Pyle). O valor máximo de HC (ng/ml) após clonidina foi de 19,2 e após hipoglicemia insulínica, de 34. As dosagens basais e após RhGH de IGF-I e IGFBP-3 foram: 331 e 301 µg/L; 4,3 e 3,9 µg/ml, respectivamente (2 DP para a IO). Cariótipo 46,XXr(15)(p11q26.2). As análises por *Southern e Northern blot* mostraram ausência de uma cópia do gene do IGF-I R1 e redução da expressão do seu RNAm. Dos 7,8 aos 8,7 anos recebeu RhGH (1,0 UI/Kg/sem. por 5 meses e depois 0,85 UI/Kg/sem.), e a velocidade de crescimento (VC) passou de 4,2 para 6,3 cm/ano. Dos 8,7 aos 9,1 anos usou RhGH (0,85 UI/Kg/sem.) e oxandrolona (0,0625 mg/Kg/dia) e a VC foi de 9,2. Dos 9,1 aos 9,7 anos usou oxandrolona (0,0625 mg/Kg/dia) e a VC foi de 5,5. Dos 9,7 aos 11,5 anos não recebeu medicação e a VC foi de 4,0. O protocolo de estudo compreendeu duas fases: A e B, com intervalo de 15 dias. Fase A (3 dias): internamento no dia 1; teste do TRH (TSH) no dia 2; dosagem do HC a cada 20 min., das 21h do dia 2 às 9h do dia 3; dosagem de IGF-I, IGFBP-2 e IGFBP-3 a cada 6h no dia 3. Fase B (15 dias de internação): balanço diário de cálcio (Ca) e nitrogênio (N); administração de RhIGF-I (*Igef, Pharmacia - Upjohn*), SC, às 8h e às 16h, na dose de 40µg/Kg/dia (dias 8 e 9), 60µg/kg/dia (dias 10 e 11) e 80µg/Kg/dia (dias 12, 13 e 8h do dia 14). Monitorização da glicemia durante o uso do RhIGF-I. Dosagem de HC, TSH, IGF-I, IGFBP-2 e IGFBP-3 nos dias 13 e 14. Os resultados foram comparados com os obtidos em normais e em pacientes com síndrome de Laron tratados com RhIGF-I. As médias das concentrações nas fases A e B foram: IGF-I, 374 e 959 µg/L (≥ 2 DP); IGFBP-2, 128 e 165 mg/ml (normais); IGFBP-3, 4,5 e 5,4 µg/ml (≥ 2 DP). Na fase B houve redução de 30% da taxa de secreção de HC, 30% da área sob a curva (AUC), 25% da amplitude média dos picos, 33% do número de picos e de 37% da concentração média. Os valores de HC nas fases A e B não diferiram significativamente ($p>0,05$). A AUC e a média da concentração diminuíram, respectivamente, 12% e 16% na fase B. Houve redução de 20% da excreção de N e aumento de 60% da excreção de Ca. A supressão parcial da secreção de HC e de TSH e o pequeno efeito sobre a excreção de Ca e N durante o uso de RhIGF-I e os níveis normais de IGFBP-2 e os valores elevados de IGFBP-3 antes e após a administração de RhIGF-I corroboram a hipótese de resistência parcial ao IGF-I. Estes dados ajudam a explicar algumas características clínicas da paciente.

ABSTRACT

The goal of this study was to test the hypothesis of IGF-I resistance in a patient with 15 ring chromosome syndrome and partial deletion of IGF-I receptor gene. The patient, product of a normal pregnancy, was born with 42 cm and 2.07 Kg. At age 5.1 y, she presented: height, 87.2 cm (H-SDS = -4,3); weight, 11.1 Kg (4.0 Kg < 3^o percentil); triangular and asymmetrical facies; vaulted *pallatus*; prominent ears; *café-au-lait* spots; mild mental retardation; bone age 30 months (G&P). Peak levels of GH following clonidine and insulin were 19.2 and 34 ng/ml, respectively. Basal levels of IGF-I (μ g/L) and IGFBP-3 (mg/L) were 331 and 4.3, and after RhGH 301 and 3.9, respectively (2 SD for bone age). Karyotype was 46,XXr(15)(p11q26.2). Southern and Northern blot analysis showed a 50% reduction of DNA and mRNA of the IGF-I receptor gene. From age 7.8 to 8.7 y, she was treated with RhGH (1 IU/Kg/w; 0.85 IU/Kg/w) and her height velocity (HV) increased from 4.2 to 6.3 cm/y. From age 8.7 to 9.1 y, she received RhGH (0.85 IU/Kg/w) plus oxandrolone (0.0625 mg/Kg/d) and her HV was 9.2 cm/y. From 9.1 to 9.7 y, she used oxandrolone (0.0625 mg/Kg/d) and her HV was 5.5 cm/y. From 9.7 to 11.5 y, without medication, her HV was 4.0 cm/y. Our protocol was divided in two phases: A and B, with a 15-day interval. Phase A (3 days): hospital admission on day 1; TRH test (TSH) on day 2; plasma samples every 20 minutes from 9 PM to 9 AM for GH, and serum samples every 6h for IGF-I, IGFBP-2 and IGFBP-3 determinations on days 2 and 3. Phase B (15 days): daily calcium (Ca) and nitrogen (N) balance; RhIGF-I administration (*Igef, Pharmacia-Upjhon*), 40 μ g/Kg/d (days 8 and 9), 60 μ g/Kg/d (days 10 and 11) and 80 μ g/Kg/d (days 12, 13 and at 8 AM on day 14) SC, twice daily. Blood glucose was monitored throughout RhIGF-I administration. Plasma and serum samples for GH, TSH, IGF-I, IGFBP-2 and IGFBP-3 were collected on days 13 and 14. The data were compared to those of normal subjects and Laron syndrome patients treated with RhIGF-I. During phases A and B, mean concentrations were: IGF-I, 374 and 959 μ g/L (both \geq 2 SD); IGFBP-2, 128 and 165 mg/ml (both normal); IGFBP-3, 4.5 and 5.4 μ g/ml (both \geq 2 SD). During phase B GH secretion rate and area under the curve (AUC) reduced 30% and mean amplitude, number of pulses and mean concentration were 25%, 33% and 37% respectively lower. GH mean concentrations during phases A and B were not significantly different ($p > 0,05$). Mean TSH concentration and AUC during TRH test were respectively 12% and 16% lower in phase B. N excretion decreased 20% and Ca excretion increased 60%. Partial suppression of GH and TSH secretion and mild effect upon N and Ca excretion during RhIGF-I treatment and normal IGFBP-2 and high levels of IGFBP-3 before and during RhIGF-I administration, corroborate the hypothesis of partial resistance to endogenous IGF-I. These data could help to explain most of the clinical data presented by the patient.

1 INTRODUÇÃO

Os *insulin-like growth factors* (IGF) são polipeptídios de cadeia única estruturalmente homólogos à insulina. Regulam a proliferação e a diferenciação de uma variedade de tipos celulares e são capazes de exercer efeitos metabólicos insulina-símile. Ao contrário da insulina, são produzidos pela maioria dos tecidos e são abundantes na circulação (COHICK & CLEMMONS, 1993).

O *insulin-like growth factor-I* (IGF-I) é secretado pelo fígado em resposta ao estímulo pelo hormônio de crescimento (HC) (PHILLIPS *et al.*, 1990). O IGF-I inibe a secreção de HC diretamente ou através do *feedback* negativo sobre a secreção do hormônio liberador de hormônio de crescimento (GHRH) e do estímulo da secreção de somatostatina (SS). A administração de IGF-I recombinante humano (RhIGF-I) suprime rapidamente a secreção pulsátil de HC (GULER *et al.*, 1987; GULER *et al.*, 1989; ZENOBI *et al.*, 1992; VACCARELLO, *et al.*, 1993).

O IGF-1 tem capacidade de agir por mecanismos endócrinos, parácrinos e autócrinos. O IGF-I exerce seus efeitos através da interação com o receptor de IGF-I tipo 1 (IGF-I R1), homólogo ao receptor da insulina. O gene humano que codifica a síntese do IGF-I R1 está localizado no cromossoma 15 (15q→qter) (ULLRICH *et al.*, 1986).

Pacientes com cromossoma 15 em anel (r15Crom.) podem apresentar deleção do gene do IGF-I R1 e teoricamente poderiam ter algum grau de resistência ao IGF-I (FRANCKE *et al.*, 1988; ROBACK *et al.*, 1991; TAMURA *et al.*, 1993).

O IGF-I medeia a maioria dos efeitos promotores do crescimento do HC (SALMON & DAUGHADAAY, 1957). A importância do IGF-I na regulação dos efeitos do HC sobre o crescimento no período pós-natal está bem estabelecida.

No período pré-natal, parece que o HC tem pouca influência sobre o crescimento fetal, ao contrário do IGF-I. Crianças com deficiência congênita de HC ou com defeito no receptor de HC apresentam leve retardo de crescimento ao nascer (SAVAGE *et al.*, 1993;

WOODS *et al.*, 1995). Camundongos transgênicos com *knockout* do gene do IGF-I apresentam retardo de crescimento pré e pós-natal severo (LIU *et al.*, 1993; POWELL-BRAXTON *et al.*, 1993). Tecidos fetais expressam IGF-I no início da gestação, e a concentração sérica de IGF-I fetal e a do cordão correlacionam-se com o tamanho fetal (HAN *et al.*, 1988; GIUDICE *et al.*, 1995).

O IGF-I e seus receptores parecem ser particularmente importantes para o desenvolvimento cerebral. O RNAm de IGF-I está presente em tecidos neurais mesenquimais indiferenciados, e níveis elevados de IGF-I R1 são encontrados no início do desenvolvimento (AGUIRRE *et al.*, 1996). Fetos de roedores com mutações do gene do IGF-I R1 têm cérebros pequenos, mielinização defeituosa e número menor de neurônios hipocâmpais (NIELSEN *et al.*, 1991). Camundongos com *knockout* do gene do IGF-I também possuem alterações do desenvolvimento neurológico, indicando que o IGF-I pode ter papel específico no crescimento axonal e na mielinização (BECK *et al.*, 1995).

WOODS *et al.* descreveram um paciente com deleção parcial do gene do IGF-I, com retardo de crescimento intra-uterino e pós-natal severo, surdez sensorineural, microcefalia e retardo mental (WOODS *et al.*, 1996).

Pacientes com r15Crom. apresentam baixa estatura (100%), retardo mental (95%) e retardo de crescimento pré-natal (82%) (BUTLER *et al.*, 1988). Pacientes com r15Crom. e ausência de uma cópia do gene do IGF-I R1 apresentam retardo de crescimento pré e pós-natal severo. Aqueles com r15Crom. e com as duas cópias do gene presentes têm retardo de crescimento leve. Com base nestas observações, surgiu a hipótese de que o retardo de crescimento pré e pós-natal desses pacientes poderia ser causado pela deleção do IGF-I R1 com conseqüentes anormalidades estruturais e/ou numéricas dos receptores (ROBACK *et al.*, 1991).

SIEBLER *et al.* (1995) demonstraram que a expressão do gene do IGF-I R1 está diminuída em dois pacientes com deleção do gene do IGF-I R1. Contudo, estudos *in vitro* com culturas de fibroblastos não evidenciaram diminuição da atividade biológica do IGF-I.

A avaliação da secreção espontânea de HC e da secreção estimulada de TSH, bem como da excreção urinária de Ca e N, após a administração de RhIGF-I, é inédita em pacientes com deleção do gene do IGF-I R1.

No presente estudo será testada a hipótese de que a deleção parcial do gene do IGF-I R1 em uma paciente com r15Crom. poderia acarretar resistência à ação do IGF-I. Sendo assim, os efeitos da administração de RhIGF-I sobre a secreção hipofisária de HC e de TSH estariam ausentes ou diminuídos. Igualmente, os efeitos metabólicos do RhIGF-I como a retenção de nitrogênio (N) ou o aumento da excreção renal de cálcio (Ca) estariam afetados.

Nesse sentido, os objetivos deste estudo são os a seguir descritos.

1.1 OBJETIVOS

- Estudar o efeito da administração de RhIGF-I sobre a secreção espontânea de HC em uma paciente com deleção parcial do gene do IGF-I R1.
- Avaliar o efeito da administração de RhIGF-I sobre a secreção estimulada de TSH em uma paciente com deleção parcial do gene do IGF-I R1.
- Avaliar o efeito anabólico do RhIGF-I através da dosagem urinária de Ca e N em uma menina com deleção parcial do gene do IGF-I R1.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 SÍNDROME DO CROMOSSOMA 15 EM ANEL

2.1.1 Cromossoma 15 (crom.15)

O crom.15 é um dos maiores acrocêntricos do cariótipo humano. Caracteriza-se por possuir um braço muito curto (p) e outro muito longo (q). O braço curto apresenta uma única região, delimitada pelo centrômero e pelo telômero, onde aparecem três bandas. No braço longo aparecem duas regiões demarcadas pelo centrômero e por uma banda proeminente de posição intermediária (região 1). Esta mesma banda e o telômero delimitam a região 2. Pode-se observar cinco bandas na região 1 e seis bandas na região 2 (THOMPSON, 1993 a).

2.1.2 Cromossoma em Anel

O cromossoma em anel é formado quando um cromossoma sofre duas quebras e suas extremidades se unem constituindo uma estrutura em anel. Se o centrômero estiver com o anel, os dois fragmentos distais, sem centrômero, são perdidos. Este mecanismo presume a perda de material cromossômico, especialmente dos segmentos terminais. Cromossomas em anéis são muito raros, mas podem ocorrer em qualquer um dos cromossomas humanos (THOMPSON, 1993 b).

Os anéis podem sofrer dificuldades na mitose, quando as duas cromátides irmãs tentam a disjunção na anáfase. Pode haver quebra do anel seguida de fusão, resultando em anéis maiores e menores. Devido a esta instabilidade mitótica, não é incomum que cromossomas em anéis sejam encontrados em apenas uma parcela das células (THOMPSON, 1993 b).

2.1.3 Características Clínicas

O r15Crom. parece ser uma anormalidade cromossômica rara. NIELSEN & SILLESEN não encontraram nenhum caso entre 11.148 recém-natos estudados (NIELSEN & SILLESEN, 1975, citados por FRYNS *et al.*, 1986).

A síndrome do r15Crom. foi descrita em 1966 (JACOBSEN, 1966). Desde então, cerca de 40 casos foram reportados (BUTLER *et al.*, 1988; FUJIMAKI *et al.*, 1987; BORGHGRAEF *et al.*, 1988; DE JONG *et al.*, 1989; KITATANI *et al.*, 1990; HORIGOME *et al.*, 1992; TAMURA *et al.*, 1993; NUUTINEN *et al.*, 1995; SIEBLER *et al.*, 1996).

As anormalidades fenotípicas mais frequentes são: baixa estatura (100%), retardo mental variável (95%), microcefalia (88%), retardo de crescimento pré-natal (82%), baixo peso ao nascimento (73%), hipertelorismo (46%), braquidactilia (44%) e face triangular (42%). Outros achados incluem: idade óssea atrasada (75%), atraso na fala (39%), base nasal alargada (37%), bossa frontal (36%), orelhas anômalas (30%), manchas café com leite (30%), criptorquidia (30%), alterações cardíacas (30%), micrognatismo (29%), clinodactilia do 5º dedo (26%), mãos pequenas (23%) e palato em ogiva (22%) (BUTLER *et al.*, 1988).

A idade média ao diagnóstico para todos os casos foi de 8.1 anos para os 17 pacientes do sexo feminino e 10 masculinos, variando de 7 meses a 41 anos. A média de idade paterna e materna ao nascimento foi 31 e 28 anos, respectivamente. Até o momento 6 pacientes adultos com r15Crom. são conhecidos (BUTLER *et al.*, 1988; HORIGOME *et al.*, 1992).

O seguimento de três pacientes mostrou que os estigmas faciais se tornaram menos evidentes na idade escolar e desapareceram completamente após a puberdade (FRYNS, 1990).

A síndrome do r15Crom. e a síndrome de Russel-Silver (SRS) possuem características fenotípicas em comum, tais como retardo de crescimento pré e pós-natal, face triangular, anomalias digitais, manchas café com leite e idade paterna avançada. Frequentemente pacientes com r15Crom. recebem o diagnóstico equivocado

de SRS. WILSON *et al.* (1995) compararam os achados clínicos das duas síndromes e observaram que os indivíduos com r15Crom. apresentam dismorfismos mínimos, deficiência de crescimento e um padrão característico de malformações.

Indivíduos com r15Crom. são predominantemente do sexo feminino, com alta incidência de microcefalia, retardo mental, anomalias faciais, anomalias de membros e defeitos cardíacos. Pacientes com SRS são predominantemente masculinos e com incidência aumentada de assimetria esquelética. Anormalidades endócrinas como deficiência de HC e hipopituitarismo são mais típicas da SRS (WILSON *et al.*, 1985).

As alterações cromossômicas autossômicas geralmente são diagnosticadas em pacientes com síndromes de anomalias congênitas múltiplas e retardo mental grave ou profundo. Uma das poucas exceções a esta regra é a síndrome do r15Crom. Pacientes com r15Crom. geralmente apresentam retardo mental leve a moderado: 15% com inteligência subnormal (QI > 74), 20% com retardo mental leve (QI 68-52), 45% com retardo mental moderado (QI 51-36) e 15% com retardo mental grave (QI 35-20) (BORGHGRAEF *et al.*, 1988).

Complicações neurológicas são raras: crises epiléticas ocorreram em três dos quatro pacientes com retardo mental grave (BENADIBA *et al.*, 1981; KISS & OSZTOVICS, 1982; FRYNS *et al.*, 1986).

A função reprodutiva foi descrita em seis pacientes adultos (três homens e três mulheres) com r15Crom.: dois homens possuíam criptorquidia e hipogenitalismo (JACOBSEN, 1966; MEINECKE & KOSKE-WESTPHAL, 1980) e dois tinham oligo e azoospermia (JACOBSEN, 1966; MOREAU & TEYSSIER, 1982). Uma das mulheres apresentava hipoplasia uterina e teve um filho normal, um aborto espontâneo e um filho afetado (HORIGOME *et al.*, 1992). Outra paciente teve uma criança com r15Crom. e um aborto espontâneo (FUJIMAKI, 1987).

2.1.4 Crom. 15 em Anel e Crescimento

Tipicamente os pacientes com r15Crom. apresentam crescimento simétrico, paralelo às curvas padrões, porém consideravelmente abaixo do 3º percentil (BUTLER *et al.*, 1988; ROBACK *et al.*, 1991). Baixa estatura ocorre em 100% dos casos (BUTLER *et*

al., 1988). Retardo de crescimento pré-natal, embora muito comum, não ocorre em todos os casos: talhe menor que 46cm ao nascimento (18 entre 21 pacientes) e peso menor que 2500g (23 entre 30 pacientes) nos nascidos a termo (BUTLER *et al.*, 1988).

A estatura final dos indivíduos com r15Crom. é conhecida em cinco pacientes: 116, 151.5 e 140 cm para o sexo feminino (FRYNS *et al.*, 1986; MEINECKE & KOSKE-WESTPHAL, 1980; HORIGOME *et al.*, 1992); 150 e 153 cm para o sexo masculino (JACOBSEN, 1966; MOREAU & TEYSSIER, 1982).

Em mais de 40% dos casos de cromossomas autossômicos em anéis os pacientes apresentam retardo de crescimento severo, independente do cromossoma envolvido (KOSZTOLÁNYI, 1987). Na maioria deles esta é a única anormalidade fenotípica. Há pouca informação sobre como o cromossoma aberrante contribui para este fenótipo. Sugeriu-se que a deficiência de crescimento poderia estar relacionada com a instabilidade estrutural e comportamental dos anéis (LEDBETTER *et al.*, 1980; KOUSSEF, 1980; YUNIS *et al.*, 1981 citados por KOSZTOLÁNYI & PAP, 1986).

Cromossomas em anel estão sujeitos a dificuldades mitóticas. A troca entre a cromátide irmã e um anel produz configurações secundárias como anéis dicêntricos, anéis interligados, pontes anafásicas, projeções nucleares, micronúcleos e cromossomas pulverizados (NISS *et al.*, 1975; LEDBETTER *et al.*, 1980; YUNIS *et al.*, 1981 citados por KOSZTOLÁNYI & PAP, 1986). As células que contêm estas anormalidades sobrevivem menos por causa de um desequilíbrio genético. Logo, certa proporção de células com cromossoma em anel será perdida nas divisões celulares subseqüentes.

KOSZTOLÁNYI & PAP realizaram estudos *in vitro* com culturas de linfócitos e fibroblastos de uma criança com r15Crom. e intenso retardo de crescimento. Observaram que cromossomas em anel eram vistos após o 1º ciclo de divisão celular, indicando que células defeituosas também poderiam ser geradas *in vivo*. A taxa de morte celular estava aumentada na cultura de fibroblastos do paciente em relação aos controles. A produção persistente de células com mortalidade elevada resultaria na redução do número de células viáveis esperadas para qualquer período do

desenvolvimento. O efeito final seria a redução marcante da massa corporal. Sugeriu-se que, muito mais que a perda de material genético originada pela formação do anel, o comportamento específico do anel e sua estrutura *per se* causariam o retardo de crescimento (KOSZTOLÁNYI & PAP, 1986). A biópsia intestinal mostrou atrofia de mucosa intestinal. Este achado foi considerado manifestação do aumento da mortalidade celular, pois o epitélio da mucosa intestinal está continuamente em proliferação e possui taxa elevada de renovação celular. Mudanças na taxa de multiplicação celular podem resultar em alterações morfológicas da mucosa, especialmente no padrão das vilosidades. A atrofia da mucosa poderia ser consequência da mortalidade celular elevada, causada por instabilidade estrutural e comportamental do anel (KOSZTOLÁNYI & PAP, 1986).

KOSZTOLÁNYI analisou a viabilidade celular (ViC) e a formação de colônias (FC) em cultura de fibroblastos de duas crianças com retardo de crescimento e cromossoma em anel (caso 1 de cromossoma 4 em anel e caso 2 de r15Crom.). Observou crescimento muito lento das culturas de fibroblastos e ViC reduzida em relação aos controles. As células do paciente 2 apresentaram uma surpreendente redução da capacidade de clonagem (KOSZTOLÁNYI, 1987). Postulou-se, então, que a ViC diminuída nestes casos era devida à produção permanente de células hipomodais, consideradas não viáveis baseando-se na extrema raridade da viabilidade de pacientes com monossomias autossômicas. A geração contínua de células com mortalidade elevada parece ocorrer também *in vivo*, resultando em redução do número total de células viáveis durante os períodos de crescimento pré e pós-natais (KOSZTOLÁNYI & PAP, 1986).

O fenótipo dos pacientes com r15Crom. pode ser, em um número substancial de casos, decorrente principalmente de alterações estruturais e não por ganho ou perda de material genético (KOSZTOLÁNYI, 1987).

Pacientes com r15Crom. foram submetidos à avaliação hormonal para investigação da baixa estatura. Foram encontrados valores séricos normais de HC e IGF-I (WILSON *et al.*, 1985; KOSZTOLÁNKI & PAP, 1986; BUTLER *et al.*, 1988;

HORIGOME *et al.*, 1992; TAMURA *et al.*, 1993; SIEBLER *et al.*, 1996). NUUTINEN *et al.* descreveram o caso de um menino com retardo de crescimento pré e pós-natal acentuado, com resposta normal de HC à clonidina e diminuída à insulina, níveis baixos de IGF-I, IGFBP-1 elevada e IGFBP-3 normal. Este paciente foi tratado com HC por dois anos (0,16UI/Kg/dia). Com o tratamento, houve aumento da VC, normalização dos níveis de IGF-I e IGFBP-1 e aumento da IGFBP-3 (NUUTINEN *et al.*, 1995). Até então não havia relatos de alterações hormonais em pacientes com r15Crom.

Após o mapeamento do gene do IGF-I R1 no crom.15 (ULLRICH *et al.*, 1986) surgiu a descrição de deleção do gene do IGF-I R1 em pacientes com r15Crom. (FRANCKE *et al.*, 1988; ROBACK *et al.*, 1991; TAMURA *et al.*, 1993; SIEBLER *et al.*, 1996). Aqueles com ausência de uma cópia do gene apresentavam retardo de crescimento pré e pós-natal importante. Quando as duas cópias do gene estavam presentes, o retardo de crescimento era leve. Assim surgiu a hipótese de que o retardo de crescimento dos pacientes com r15Crom. poderia ser causado por anormalidades numéricas e/ou estruturais dos IGF-I R1.

SIEBLER *et al.* constataram que a expressão e a função do receptor de IGF-I estavam diminuídas em fibroblastos de dois pacientes com deleção distal do braço longo do crom.15. Os dois pacientes apresentavam retardo de crescimento pré-natal importante. O paciente que sobreviveu teve retardo de crescimento pós-natal acentuado, níveis de HC basal e após estímulo normais, uma dosagem elevada de IGF-I e outras normais. Este paciente recebeu HC (0,375mg/Kg/semana) e apresentou discreto aumento inicial da VC, o qual não se manteve. Embora a expressão do IGF-I R1 estivesse diminuída nos fibroblastos dos dois pacientes, não foram obtidas evidências conclusivas de redução da resposta biológica ao IGF-I. Deve-se ter cuidado ao se extrapolar achados *in vitro* de fibroblastos para situações *in vivo*. É possível que, *in vivo*, para alguns tecidos, o número de receptores esteja mais relacionado à resposta biológica ao IGF-I do que no caso dos fibroblastos em cultura, e que a redução do número de receptores resultaria em resposta de crescimento diminuída ao IGF-I (SIEBLER *et al.*, 1995).

2.2 INSULIN-LIKE GROWTH FACTORS (IGF)

2.2.1 Aspectos Históricos

Os IGFs são membros de uma grande família de peptídios estruturalmente relacionados à insulina: IGF-I, IGF-II, insulina e relaxina (BLUNDELL *et al.*, 1983), que divergiram de um ancestral comum durante o período evolutivo. Como consequência desta divergência tornaram-se sujeitos a diferentes padrões regulatórios e adquiriram novos papéis biológicos.

Os IGFs foram primeiramente descobertos como três atividades séricas biológicas diferentes, denominadas atividade de fator de sulfatação (SFA), atividade insulina-símile não suprimível (NSILA) e atividade estimuladora da multiplicação (MSA). Em 1957, SALMON & DAUGHADAY sugeriram que a ação promotora do crescimento do HC era mediada por uma substância definida como “atividade de fator de sulfatação”. Observaram que a captação de sulfato pela cartilagem era estimulada pelo soro de ratos normais e não pelo soro de ratos hipofisectomizados. O tratamento de ratos hipofisectomizados com HC restaurou a atividade sérica promotora de crescimento, apesar de o HC por si só não ter efeito direto. Com o desenvolvimento do radioimunoensaio para insulina, constatou-se que o soro continha muito mais atividade insulina-símile do que o que poderia ser atribuído ao seu conteúdo de insulina imunorreativa. Esta atividade insulina-símile foi chamada de NSILA (FROESH *et al.*, 1963 citado por SARA & HALL, 1990).

A terceira linha de investigação tratou da procura de constituintes séricos necessários para o crescimento celular em cultura. Estudos indicaram que a proliferação celular em algumas linhagens dependia da presença de fatores séricos específicos, enquanto em outras linhagens as células produziam suas próprias substâncias promotoras de crescimento. Tal atividade foi denominada de MSA e identificada em hepatócitos de ratos (DULAK & TEMIN, 1973 citado por SARA & HALL, 1990).

Posteriormente, tornou-se aparente que todas as três atividades representavam um grupo similar, se não idêntico, de substâncias com atividade

biológica muito maior do que se suspeitava inicialmente. Desde então introduziu-se o termo somatomedina (DAUGHADAY *et al.*, 1972). O prefixo “somato” sugere a relação hormonal com a somatotropina (HC) e também com o soma, que é o tecido alvo deste agente. “Medin” foi incluído no nome para indicar seu papel intermediário na ação da somatotropina.

Em 1978, todos os membros dessa família de peptídios promotores de crescimento e com atividade insulina-símile estavam quimicamente caracterizados e sua estrutura primária determinada. Purificou-se com sucesso NSILA de uma amostra de plasma humano e concluiu-se que esta atividade consistia em dois peptídios biologicamente ativos denominados de IGF-I e IGF-II (RINDERKNECHT & HUMBEL, 1976 e 1978 a).

Nos dez anos após a caracterização dos IGFs, avanços técnicos em química protéica, e especialmente o desenvolvimento de técnicas de biologia molecular, resultaram na identificação genética e protéica de várias atividades biológicas suspeitas de pertencerem à família das somatomedinas. Esses estudos apenas revelaram peptídios idênticos ao IGF-I e IGF-II ou formas variantes. Ficou evidente que apenas o IGF-I é diretamente regulado pelo HC (HALL & SARA, 1983 citado por SARA & HALL, 1990; BAXTER, 1986) e que a produção de IGF-II não é primariamente controlada pelo HC. Pelo fato de o termo somatomedina ter sido escolhido por implicar regulação pelo HC, o termo somatomedina tornou-se inadequado para denominar estes peptídios homólogos. Em 1987 recomendou-se que o termo *Insulin-Like Growth Factors* (IGF) fosse empregado para se referir a esta família de peptídios (DAUGHADAY *et al.*, 1987).

Nos anos seguintes demonstrou-se que o HC injetado diretamente na placa cartilaginosa tibial estimulava o crescimento ósseo contralateral (ISAKSSON *et al.*, 1985). Constatou-se que este efeito local do HC poderia ser bloqueado por anticorpos contra somatomedina-C, indicando que a ação do HC na cartilagem era mediada pela produção local de IGF (SCHLECHTER *et al.*, 1986). Permanecia desconhecida a importância da ação local do HC para a estimulação do crescimento normal. A

estimulação máxima do crescimento longitudinal da tíbia produzida pela administração local de HC foi apenas uma pequena fração daquela produzida por via sistêmica. O mesmo se aplicou à capacidade do HC de estimular o aumento da placa epifisária quando injetado localmente (DAUGHADAY, 1989). Estes achados sugerem que os IGF que atingem a cartilagem pela circulação, bem como aqueles produzidos localmente, são necessários para a promoção do crescimento normal.

Durante o processo de purificação dos IGF observou-se que eles estavam presentes na forma de pesos moleculares maiores. Constatou-se que estas formas representam IGF associados a suas proteínas ligadoras (BP) (BAXTER & MARTIN, 1989).

2.2.2 Regulação da Produção de IGF

Os IGF são considerados hormônios de distribuição universal. São secretados pela maioria dos tecidos em resposta ao HC e circulam no plasma ligados a proteínas. Evidências sugerem um papel autócrino (IGF-I estimulando a própria célula que o secretou) e parácrino (estimulação de células adjacentes) ao invés do conceito endócrino clássico (estimulação de células distantes).

2.2.2.1 Parácrina

Grande variedade de órgãos e células produzem IGF como hormônios parácrinos locais (HALL & BOZOVIC, 1969; D'ERCOLE & APPELWHITE, 1980). A expressão dos genes dos IGF, bem como a presença dos peptídios em muitos tecidos adultos e fetais, foi demonstrada, estabelecendo a biossíntese local e o papel parácrino.

Os mecanismos que regulam a produção parácrina dos IGF estão sendo elucidados. O HC é considerado o principal regulador da expressão do gene do IGF-I no fígado adulto e em tecidos extra-hepáticos (MATHEWS *et al.*, 1986; ROBERT *et al.*, 1986 e 1987; HYNES *et al.*, 1987 citados por SARA & HALL, 1990). Demonstrou-se que os RNAm são traduzidos em proteínas em tecidos como coração e pulmão (D'ERCOLE *et al.*, 1984). Do mesmo modo, a indução do crescimento

esquelético pelo HC é mediada pela estimulação local da produção de IGF-I. A regulação da expressão do gene do IGF-I pelo HC parece ser rápida e ocorrer sob a transcrição (DOGLIO *et al.*, 1987, citado por SARA & HALL, 1990). Hormônios associados ao HC, como a prolactina ovina, têm a capacidade de elevar a expressão hepática do gene do IGF-I em ratos (MURPHY *et al.*, 1988). A resposta ao HC é evolutivamente dependente, presumivelmente devido à ausência de receptores de HC maduros. O HC não estimula a produção fetal de IGF-I (ROMANUS *et al.*, 1985 citado por HALL & SARA, 1990) e conseqüentemente não provoca resposta de crescimento durante o início do desenvolvimento (PHILIPPS *et al.*, 1988).

Ao utilizar fibroblastos de ratos, demonstrou-se que a produção de IGF-II é controlada principalmente pelo lactogênio placentário e não pelo HC. Com a maturação, os fibroblastos passam a produzir IGF-I, sob regulação do HC.

Hormônios tróficos parecem capazes de controlar a biossíntese parácrina do IGF-I. Não apenas o HC, mas também o fator de crescimento derivado da placa epifisária e o fator de crescimento do fibroblasto podem estimular a produção de IGF-I pelos fibroblastos humanos *in vitro* (CLEMMONS & SHAW, 1983 citado por JONES & CLEMMONS, 1995). Hormônios tróficos como hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), TSH, hormônio luteinizante (LH) e folículo-estimulante (FSH), além das suas ações clássicas na produção hormonal secundária, estimulam a biossíntese parácrina de IGF-I por seus órgãos alvos (AMMOND *et al.*, 1985; MINUTO *et al.*, 1993). Logo, o efeito promotor de crescimento de muitos hormônios é mediado via estimulação da produção local de IGF-I. A inibição do crescimento produzida pela dexametasona em neurônios e células gliais de rato, por exemplo, é mediada de forma semelhante via redução do RNAm do IGF-I (ADAMO *et al.*, 1988 citado por SARA & HALL, 1990).

Acredita-se que a nutrição desempenhe papel fundamental no controle da produção de IGF durante a vida. Apesar de os níveis circulantes de IGF serem claramente dependentes da nutrição, o papel de vários substratos na regulação parácrina precisa ser caracterizado.

A biossíntese de IGF-I aumenta em resposta a danos teciduais locais. A elevação da imunorreatividade do IGF-I durante a regeneração tecidual por injúria foi observada em nervos periféricos de ratos, músculo esquelético e células endoteliais arteriais (HANSSON *et al.*, 1986; HANSSON *et al.*, 1987; JENNISCHE *et al.*, 1987 citados por SARA & HALL, 1990). A expressão do gene de IGF-I aumenta na hipertrofia renal compensatória após nefrectomia unilateral (FAGIN & MELMED, 1987). O IGF-I está envolvido no reparo de danos teciduais via estimulação do anabolismo e crescimento de novas células.

2.2.2.2 Endócrina

Conforme o modelo endócrino clássico de ação, o IGF-I age em células alvo após ser secretado na circulação. Estudos iniciais indicaram que vários órgãos alvo do HC poderiam ser fontes de IGF-I (HALL & BEZOVIC, 1969). O fígado é a maior fonte de IGF-I circulante (SCHANDER *et al.*, 1983).

IGF-I e IGF-II estão ligados a grandes proteínas carreadoras no soro ou plasma e não podem ser medidos livres pelos radioimunoensaios mais sensíveis (SARA & HALL, 1990). Os IGF e as IGFBP foram identificados na linfa (BINOUX & HOSSENLOPP, 1988 citado por SARA & HALL, 1990) e em outros fluídos exócrinos como o leite materno, líquido amniótico e saliva (CHOCHINOV *et al.*, 1977; CORPS *et al.*, 1988; COSTIGAN *et al.*, 1988, citados por SARA & HALL, 1990). A maioria do IGF-I sérico de adultos saudáveis (80%) está ligada à IGFBP 150K, regulada pelo HC (PÓVOA *et al.*, 1989). A minoria se liga à IGFBP 25K. A IGFBP 150K é considerada uma proteína de armazenamento; sua presença explica a concentração de 10 a 100 vezes maior de IGF-I e IGF-II no soro que a necessária para produzir os efeitos promotores do crescimento *in vitro*. A IGFBP 150K presumivelmente garante que um suplemento constante de IGF esteja disponível para os tecidos. A presença da IGFBP 150K explica a meia vida em torno de 24 horas dos IGF endógenos, enquanto os IGF exógenos livres têm meia vida muito curta, semelhante à da insulina. O IGF-I truncado tem pouca afinidade pela BP e apresenta meia vida na circulação mais curta comparado ao IGF-I (SARA & HALL, 1990).

Quando os IGF são medidos diretamente no soro ou no plasma, deve-se considerar a influência das BP (HALL & SARA, 1984). Os resultados obtidos dependem do equilíbrio entre a ligação dos IGF às BP e a anticorpos ou receptores utilizados. Condições diferentes de equilíbrio, congelamento, armazenamento, adição de heparina ou pratamina e material do tubo influenciam os resultados (FURLANETTO, 1982).

Para medir quantidades totais de IGF é necessário separar os IGF de suas BP. A dissociação pode ser obtida por acidificação e a separação através de cromatografia em gel ácido (DAUGHADAY *et al.*, 1980). A maioria das IGFBP-3 é separada dos IGF por este processo, mas o método não elimina as IGFBP-1. Se as concentrações séricas de IGFBP-1 forem baixas, ocorre pouca interferência nas medidas. Se as concentrações de IGFBP-1 forem altas em comparação com as de IGF, como, por exemplo, no período neonatal, em pacientes com deficiência de HC ou em jejum, obtêm-se falsos resultados. Nessas situações o uso de IGF-I truncado como radioligante para determinações de IGF-I por radioimunoensaio (RIE) é confiável com a extração ácida em etanol. O uso de anticorpos de alta afinidade fornece valores próximos do total (HALL *et al.*, 1979). Vários RIE foram desenvolvidos usando anti-soro policlonal para medir especificamente IGF-I ou IGF-II. Permanece desconhecido até que ponto estes métodos também detectam formas variantes (SARA & HALL, 1990).

A discrepância entre as concentrações de IGF relatadas deve-se freqüentemente a diferentes técnicas de dosagem. Outro problema, quando se comparam resultados de diferentes laboratórios, é a falta de um padrão internacional comum (BANG & HALL, 1992). Não há ritmo diurno aparente de IGF-I, IGF-II ou de IGFBP 150K; logo, o horário da coleta é irrelevante.

A dependência dos padrões de IGF e IGFBP em relação à idade é bem estabelecida. Os níveis séricos de IGF-I são baixos no período pré-natal e ao nascimento; elevam-se durante a infância a partir dos 6 aos 12 meses; atingem altos níveis na puberdade e depois declinam com o avançar da idade (HALL *et al.*, 1980). O pico máximo da concentração de IGF-I coincide com o estirão puberal e reflete o

aumento da produção de HC. Níveis séricos elevados de IGF-I após a puberdade só são vistos em pacientes acromegálicos (HALL *et al.*, 1980). Padrões semelhantes foram obtidos em ratos, nos quais a elevação do IGF-I começa quando o crescimento se torna dependente do HC (SARA *et al.*, 1980).

O IGF-I aumenta continuamente durante a gravidez, atinge níveis duas a três vezes maiores no último trimestre, apesar da atenuação da secreção hipofisária de HC (HALL *et al.*, 1984). Esta elevação também ocorre em gestantes com deficiência hipofisária de HC. Estes dados, somados à redução rápida do IGF-I após o parto, sugerem que o lactogênio placentário, ou uma forma variante de HC placentário, substitui o HC na gestação (HALL *et al.*, 1980; HALL *et al.*, 1984).

Os níveis séricos de IGF-I estão baixos em indivíduos com deficiência completa de HC; os menores níveis são encontrados nos pacientes com síndrome de Laron (DAUGHADAY & TRIVEDI, 1987). A administração de HC induz ao aumento sérico de IGF-I em pacientes com deficiência de HC e em indivíduos normais. A elevação inicial do IGF-I durante os primeiros dias de tratamento com HC, em crianças com baixa estatura e concentração integrada de HC diminuída, correlaciona-se positivamente com o crescimento (ALBERTSSON-WIKLAND & HALL, 1987). Contudo, este achado não é uniforme (BANG & HALL, 1993). Não se sabe até que ponto tal discordância é devida à interferência de IGFBP nas análises realizadas nos diferentes estudos.

As concentrações séricas de IGF-I em pacientes com diabetes melito insulino-dependente são descritas como diminuídas, normais ou aumentadas (MERIMEE *et al.*, 1983; LANES *et al.*, 1985; HALL *et al.*, 1989). A discrepância pode ser atribuída a diferenças entre as populações estudadas ou a influências das IGFBP sobre as análises (BANG & HALL, 1992). Foram obtidas dosagens baixas de IGF-I em indivíduos hiperglicêmicos com diabetes melito insulino-dependente, após separação de IGFBP por cromatografia em pH ácido. Melhora da terapia insulínica resultou em redução dos níveis glicêmicos e aumento significativo do IGF-I. Baixos níveis de IGF-I nesse tipo de diabetes não são causados por redução da secreção de HC. A concentração de HC avaliada em 24

horas não estava suprimida. Resposta bloqueada do IGF-I ao HC exógeno foi encontrada em pacientes com diabetes melito insulino-dependente (LANES *et al.*, 1985). Concluiu-se que é preciso insulina para a liberação de IGF-I endócrino induzida pelo HC.

No rato, o aumento de IGF-I estimulado pelo HC pode ser sinergicamente ampliado pela insulina (DAUGHADAY *et al.*, 1976). Concentrações reduzidas de IGF-I são observadas em ratos diabéticos, parcialmente atribuídas à inibição da liberação de HC. A insulina pode ter alguma participação na expressão dos receptores de HC (BANG & HALL, 1992).

O pico puberal de IGF-I e o estirão de crescimento foram atribuídos inicialmente aos androgênios. Demonstrou-se que a testosterona não tem efeito direto sobre as concentrações de IGF-I. Em meninas com síndrome de Turner, o tratamento com esteróides anabólicos não resulta em elevação do IGF-I (ROSENFELD *et al.*, 1988 citado por BANG & HALL, 1992). Acredita-se que o efeito dos androgênios durante a puberdade seja mediado através da sua ação sobre a liberação de HC endógeno (BANG & HALL, 1992).

Doses de estrogênios altas o suficiente para inibir o crescimento causam declínio na concentração de IGF-I (HALL & SARA, 1984). A redução do IGF-I também é vista durante a terapia estrogênica em pacientes acromegálicos, acompanhada de melhora clínica, apesar dos níveis inalterados de HC (CLEMMONS *et al.*, 1980 citado por JONES & CLEMMONS, 1995). O efeito supressivo dos estrogênios sobre o IGF-I endócrino está de acordo com a redução do RNAm do IGF-I hepático encontrado em ratos tratados com estrogênio. A existência da regulação tecidual específica do IGF-I deve ser lembrada, pois o estrogênio estimula a expressão do IGF-I nos osteoblastos e no útero (NORSTEDT *et al.*, 1989 citado por BANG & HALL, 1992). Em pacientes com síndrome de Cushing, o IGF-I sérico está aumentado cerca de 50% em relação aos controles (BANG & HALL, 1992).

O padrão de IGF-II difere em humanos e ratos. Nos ratos as concentrações séricas de IGF-II são altas no período pré-natal e declinam rapidamente após o nascimento (MOSES *et al.*, 1980). Em humanos, os níveis séricos de IGF-II pré-natais

são baixos; elevam-se e atingem níveis de adultos no primeiro ano pós-natal; permanecem inalterados com o avanço da idade (HALL & SARA, 1984). Não foram detectadas elevações significativas durante a puberdade. Em adultos saudáveis, após os primeiros anos de vida, as concentrações de IGF-II permanecem quatro vezes maiores que as de IGF-I durante toda a vida (ENBERG & HALL, 1984).

A expressão do gene do IGF-II não é regulada pelo HC. Não se observa elevação de IGF-II em acromegálicos; a tendência é manter a concentração nos limites inferiores da normalidade (BANG *et al.*, 1990 citado por BANG & HALL, 1992). Os níveis séricos de IGF-II declinam na deficiência de HC, provavelmente devido à redução na IGFBP-3 regulada pelo HC (HALL & SARA, 1984).

No rato, o IGF-II é principalmente um hormônio fetal e neonatal. As concentrações séricas diminuem após o nascimento e quase desaparecem da circulação quando o crescimento passa a ser regulado pelo HC (MOSES *et al.*, 1980).

No diabetes melito insulino-dependente a concentração de IGF-II estava significativamente elevada, e baixo o nível sérico de IGF-I (HALL *et al.*, 1989). O aumento do IGF-II correlacionou-se com a concentração de hemoglobina Alc. Alteração similar ocorreu em recém-natos de mães diabéticas (HALL *et al.*, 1986 citado por SARA & HALL, 1990). Esses achados levam à hipótese de que o IGF-II seria estimulado pela glicose, semelhante à insulina. O IGF-II expressa-se na placenta, e quantidades maiores de RNAm de IGF-II são encontradas em placentas de mães diabéticas. Não se sabe se a insulina tem algum efeito supressivo direto sobre o gene do IGF-II. Contudo, a administração de IGF-I suprime tanto a concentração de IGF-II como a de insulina na circulação (GULER *et al.*, 1989 a).

Corticoesteróides, inibidores do crescimento e do anabolismo, não suprimem a concentração de IGF-II no homem, mas bloqueiam o RNAm do IGF-II no rato (BECK *et al.*, 1988 citado por SARA & Hall, 1990). Pacientes com síndrome de Cushing apresentam níveis normais de IGF-II (BANG & HALL, 1992).

O estado nutricional é importante para a expressão do IGF-I, IGF-II e suas BP. Durante a deprivação calórico-protéica a dosagem sérica dos IGF deve ser

realizada por métodos que não sejam influenciados pelas IGFBP, pois a IGFBP-1 está bastante diminuída (BANG & HALL, 1992).

2.2.3 Receptores de IGF

Existem pelo menos duas classes de receptores de IGF: tipo1 e 2 (KASUGA *et al.*, 1981; CHERNAUSEK *et al.*, 1981; MASSAQUE *et al.*, 1982; ROSENFELD & HINTZ, 1986; OH *et al.*, 1993, citados por ROSENFELD, 1996). Os IGF ligam-se a receptores de insulina, embora com menor afinidade (KORNFELD *et al.*, 1987, citado por ROSENFELD, 1996).

O receptor tipo1 é semelhante ao receptor da insulina. Ambos são heterotetrâmeros compostos por duas subunidades α (Mr aparente de 130.000) e duas subunidades β (Mr aparente de 90.000). As subunidades α são ligadas por pontes dissulfídicas e contêm os sítios de ligação do IGF-I. As subunidades β possuem uma região transmembranosa, um sítio de ligação de ATP, e uma região tirosina-quinase. Parece que um mol do heterotetrâmero liga-se a um mol de IGF-I.

O receptor tipo1 é chamado de receptor de IGF-I (IGF-I R1), embora se ligue ao IGF-I e II com grande afinidade. Ambos os peptídios são capazes de ativar a tirosina-quinase após a ligação com o receptor. A afinidade do IGF-I R1 pela insulina é 100 vezes menor, o que explica o efeito mitogênico fraco da insulina.

A estrutura primária completa do IGF-I R1 foi obtida por ULLRICH *et al.* em 1986. O peptídio é formado por 1337 aminoácidos e tem massa molecular prevista de 151.869. O heterodímero traduzido é clivado nas posições 707-710 na sequência Arg-Lys-Arg-Arg (ULLRICH *et al.*, 1986).

O receptor tipo2 (IGF R2) não tem homologia estrutural com o receptor da insulina ou com o IGF-I R1. Trata-se de uma proteína monomérica com massa molecular prevista de 270.294. Possui uma região extracelular longa com 15 seqüências repetidas de 147 resíduos cada, uma porção transmembranosa com 23 resíduos e pequena parte citoplasmática com 164 resíduos. Não contém sítio de tirosina-quinase ou qualquer outro mecanismo reconhecível, sinalizador da transdução (MORGAN *et al.*, 1987 citado por ROSENFELD, 1996).

O IGF R2 é idêntico ao receptor cátion-independente-manose-6-fosfato (CIM6P), proteína envolvida com hidrolases e outras proteínas monossiladas nos lisossomas (MAcDONALD *et al.*, 1988; KORNFIELD *et al.*, 1987 citados por ROSENFELD, 1996). A maioria desses receptores está localizada nas membranas intracelulares e está em equilíbrio com a membrana plasmática (ROSENFELD *et al.*, 1987).

O IGF R2 liga-se ao IGF-II com grande afinidade, ao IGF-I com pouca afinidade e não se liga à insulina (ROSENFELD *et al.*, 1987). Os sítios de ligação para IGF-II e manose-6-fosfato parecem estar em porções diferentes do receptor.

Estudos indicam que as ações mitogênicas e metabólicas clássicas do IGF-I e II são mediadas pelo IGF-I R1, por ativação da tirosina-quinase. Anticorpos monoclonais contra o sítio de ligação do IGF-I no IGF-I R1 inibem a capacidade do IGF-I e II de estimular a incorporação de timina e a replicação celular (CONOVER *et al.*, 1987 citado por ROSENFELD, 1996; FURLANETTO *et al.*, 1987). Anticorpos policlonais bloqueadores da ligação do IGF-II ao IGF R2/manose-6-fosfato não bloqueiam as ações do IGF-II (MOTTOLA & CZECH, 1984; KIESS *et al.*, 1987; ADASHI *et al.*, 1989 citados por ROSENFELD, 1996).

Análogos de IGF-II, com pouca afinidade pelo IGF-I R1 e afinidade preservada pelo IGF R2, são marcadamente menos potentes que o IGF-II em estimular a síntese de DNA (BEUKERS *et al.*, 1991, citado por ROSENFELD, 1996). Acredita-se que as ações mitogênicas do IGF-II não sejam mediadas pelo IGF R2 (ROGERS & HAMMERMAN, 1988; TALLY *et al.*, 1987; MINNITI *et al.*, 1992 citados por ROSENFELD, 1996).

A observação de ligações competitivas anômalas sugere a existência de receptores de insulina e de IGF variantes ou atípicos (MISRA *et al.*, 1986; JONAS & COX, 1990 citados por ROSENFELD, 1996). A explicação possível para tais achados seria a existência de receptores híbridos, compostos de um dímero $\alpha\beta$ do receptor da insulina e outro $\alpha\beta$ do IGF-I R1 (FELTZ *et al.*, 1988; TREADWAY *et al.*, 1989). Estudos com anticorpos monoclonais específicos para os receptores da insulina e IGF-I

R1 indicam que os receptores híbridos podem se desenvolver espontaneamente em células com receptores nativos abundantes (SOOS & SIDDLE, 1989).

O significado fisiológico dos receptores híbridos permanece especulativo.

2.2.4 Proteínas Ligadoras de IGF (IGFBP)

As IGFBP são proteínas carreadoras de alta afinidade, solúveis, presentes em múltiplos fluídos extracelulares. Seis tipos de IGFBP foram clonados e sequenciados: IGFBP-1,2,3,4,5 e 6 (SHIMASAKI *et al.*, 1991). Cada proteína possui 200-300 aminoácidos, com seqüências sinalizadoras de 20-40 aminoácidos. As IGFBP contêm 16-20 resíduos de cisteína na porção amino e carbóxi-terminal, cujo alinhamento é conservado. Pontes dissulfídicas estabelecem os sítios de ligação de cada IGFBP; a redução química das BP resulta em perda da capacidade de ligação aos IGF (BRINKMAN *et al.*, 1991 citado por CLEMMONS, 1993).

A IGFBP-1 humana foi a primeira BP completamente caracterizada. Foi purificada do fluido amniótico e da decídua humana. A IGFBP-1 tem afinidade semelhante pelo IGF-I e II. Em pH 7,0 sua constante de afinidade é cinco vezes maior que a do IGF-I R1. O RNAm do IGF-I expressa-se fortemente na decídua humana, endométrio e fígado fetal (COHICK & CLEMMONS, 1993).

A IGFBP-2 expressa-se principalmente no fígado fetal. A afinidade da IGFBP-2 pelo IGF-II é três vezes maior que pelo IGF-I, mas sua afinidade por ambos é maior que a da IGFBP-1 em pH 7,4 (COHICK & CLEMMONS, 1993).

A IGFBP-3 é a subunidade ligadora do complexo 150KD presente no soro. Foi originalmente purificada do plasma humano. É a forma sérica mais abundante de IGFBP e tem grande afinidade pelo IGF-I e II. Liga-se a mais de 95% do IGF-I e II circulantes (BAXTER & MARTIN, 1989).

A IGFBP-4 contém um sítio de glicosilação, embora geralmente esteja presente na forma não glicosilada. Tem grande afinidade pelo IGF-I e II, semelhante à IGFBP-3 em pH 7,4 (COHICK & CLEMMONS, 1993).

A IGFBP-5 foi purificada de fontes humanas e de ratos (ANDRESS & BIRNBAUM, 1991; BAUTISTA *et al.*, 1991; BONDY *et al.*, 1992 citados por COHICK & CLEMMONS, 1993). Possui a maior afinidade pelo IGF-I e II dentre todas as IGFBP, 50 vezes maior que a afinidade pelo IGF-I R1 em pH 7,4 (COHICK & CLEMMONS, 1993).

A IGFBP-6 foi extraída de diversas fontes humanas (ANDRESS & BIRNBAUM, 1991; FORBES *et al.*, 1990; MARTIN *et al.*, 1990 citados por COHICK & CLEMMONS, 1993). Possui cerca de 10-100 vezes maior afinidade pelo IGF-II que pelo IGF-I, que é semelhante à afinidade da IGFBP-3 pelo IGF-I.

Os genes humanos para as IGFBP-1,2,3,4 e 5 estão localizados nos cromossomos 7,2,7,17 e 5, respectivamente (COHICK & CLEMMONS, 1993).

Acredita-se que as IGFBP exerçam quatro funções. A primeira função é de transportar os IGF na circulação. Em condições normais existe predomínio de IGFBP-3 circulante. A IGFBP-3 forma um complexo ternário com outra proteína, a subunidade ácido-lábil (ALS). A formação deste complexo requer a ligação do IGF-I à IGFBP-3 (BAXTER & MARTIN, 1989). A concentração do complexo parece dependente do HC e de IGF-I (CLEMMONS *et al.*, 1989). A síntese de ALS é controlada pelo HC (BAXTER, 1990). Em geral, existe excesso de ALS na circulação e a soma da concentração de IGF-I e II é igual à concentração molar de IGFBP-3. Logo, quase todo o IGF-I e II circulante está ligado a este complexo de alto peso molecular. Em algumas situações este equilíbrio pode estar alterado. Na gestação, a IGFBP-3 é proteoliticamente clivada em uma forma molecular menor (SCHMID *et al.*, 1991, citado por CLEMMONS, 1993). Esta forma possui redução de 50% da afinidade pelo IGF-I e II, embora se ligue à ALS (SUIKKARI & BAXTER, 1991, citado por CLEMMONS, 1993). Por esta razão IGF-I e II permanecem ligados ao complexo ternário no soro de gestantes. Não está determinado se esta alteração do clearance metabólico do IGF-I influencia o crescimento durante a gravidez humana.

Na deficiência de HC a ligação do IGF-I à IGFBP-3 está alterada (BAXTER & MARTIN, 1986). Neste caso a síntese de ALS e IGFBP-3 está diminuída, e a

IGFBP-2 é a proteína ligadora predominante no soro (HARDOUIN *et al.*, 1987). A maioria do IGF-I e II circula ligada à IGFBP-2.

Em um menino com deleção homozigótica do gene do IGF-I, a concentração de IGFBP-3 e de subunidade ALS estava normal. Este achado confirma o conceito de que o controle da IGFBP-3 e da subunidade ALS independe do IGF-I (WOODS *et al.*, 1996).

A distribuição de IGF-I entre as diversas BP séricas é hormônio-dependente. Quando existe excesso de HC, a capacidade de ligação é suficiente para acomodar o aumento de IGF-I. Em caso de deficiência de HC, a capacidade de ligação e os níveis totais de IGF estão diminuídos. Outros estados associados com perfil de ligação sérica alterado incluem o desenvolvimento fetal e a infusão de IGF-I. O papel exato destas mudanças não está determinado.

A segunda função das IGFBP é transportar os IGF para o espaço extravascular. IGFBP-1,2 e possivelmente a 4 atravessam superfícies endoteliais intactas (BAR *et al.*, 1990 citado por CLEMMONS, 1993). A IGFBP-3 pode atravessar se estiver na forma livre, mas não quando ligada à ALS. Por isso existe maior quantidade de IGFBP-1 e 2 na linfa em relação ao soro, enquanto a IGFBP-3 está apropriadamente diminuída.

Em condições normais, a enorme capacidade de ligação de IGFBP-1 e 2 representa um meio de transporte de IGF-I e II para sítios extravasculares de ação. IGFBP-1 e 2 podem ser importantes para transportar IGF para dentro do fluido tubular. Como o rim é o maior sítio de degradação de IGF, as IGFBP-1 e 2 devem regular a quantidade de IGF degradados.

O IGF-I atravessa aceleradamente barreiras capilares intactas após a infusão de insulina, em ratos (BAR *et al.*, 1990 citado por CLEMMONS, 1993). Este pode ser um mecanismo para determinar a distribuição de IGF-I e II entre os compartimentos intra e extravascular no período pós-prandial.

A terceira função das IGFBP é regular a distribuição dos IGF para diferentes tipos celulares no interior de órgãos e tecidos. A ação parácrina dos IGF é um mecanismo de controle da resposta de diversas populações celulares quando expostas aos IGF (CLEMMONS, 1993).

A quarta função é regular a expressão das ações biológicas dos IGF nas células. As IGFBP inibem e potencializam os efeitos metabólicos e mitogênicos dos IGF. A adição de IGFBP-1,2,3 ou 4 purificadas impede a ligação dos IGF à superfície celular, seqüestra os IGF e evita a interação com os receptores, atenuando a bioatividade dos IGF (BLAT *et al.*, 1989; MOHAN *et al.*, 1989; BURCH *et al.*, 1990; CHEUNG *et al.*, 1991 citados por COHICK & CLEMMONS, 1993). Em concentrações equimolares, a IGFBP-3 é mais efetiva que a IGFBP-1 e 2 em bloquear a ligação com a superfície celular (McCUSCKER *et al.*, 1991).

Pré-incubação de fibroblastos com IGFBP-3 potencializa a atividade do IGF-I, enquanto a co-incubação com IGFBP-3 e IGF-I inibe (BAXTER & MARTIN, 1989). O efeito potencializador está relacionado ao aumento da ligação do IGF-I ao IGFBP-3 associado à membrana (CONOVER *et al.*, 1990 citado por ROSENFELD, 1996). A IGFBP-3 liberada da superfície celular de fibroblastos fetais tem maior afinidade pelo IGF-I do que aquela que permanece na superfície celular (McCUSCKER *et al.*, 1990 citado por COHICK & CLEMMONS, 1993). O efeito potencializador da IGFBP-3 associada à superfície celular pode ser resultado da redução da sua afinidade de ligação, o que permitiria maior equilíbrio com o IGF-I R1. O mecanismo de aderência da IGFBP-3 à superfície celular é desconhecido, mas não parece necessitar glicosilação (CONOVER, 1991 citado por COHICK & CLEMMONS, 1993).

IGFBP-1 e 2 também potencializam a atividade mitogênica do IGF-I, sendo a IGFBP-1 mais potente (BOURNER *et al.*, 1992 citado por JONES & CLEMMONS, 1995). Duas formas de IGFBP-1 foram isoladas do líquido amniótico, mas apenas uma forma associada à membrana celular potencializa a atividade do IGF-I (McCUSCKER & CLEMMONS, 1992). O mecanismo pelo qual as IGFBP associadas à superfície celular potencializam a atividade dos IGF é desconhecido. Estudos com análogos de IGF, com alterações de afinidade pelas IGFBP e pelos IGF-I R1, indicam que é necessária a ligação do IGF-I com IGFBP-1 e IGF-I R1 (CLEMMONS *et al.*, 1990 citado por COHICK & CLEMMONS, 1993).

Demonstrou-se que a IGFBP-5 potencializa as ações proliferativas do IGF-II em osteoblastos (BAUTISTA *et al.*, 1991 citado por JONES & CLEMMONS, 1995).

A mistura de IGFBP-5 e 6 aumenta a mitogênese estimulada pelo IGF-I em células de osteossarcoma (ANDRESS *et al.*, 1991 citado por COHICK & CLEMMONS, 1993). Não foi preciso pré-incubar com IGFBP para potencializar a atividade dos IGF, e a habilidade dos IGF de associação com membranas celulares não foi determinada.

IGFBP-1 não fosforilada purificada do líquido amniótico humano potencializa o efeito do IGF-I sobre a síntese de DNA, enquanto a forma fosforilada parece inibir (COHICK & CLEMMONS, 1993).

2.2.5 Efeitos da Administração de RhIGF-I em Humanos

2.2.5.1 Indivíduos normais

A infusão endovenosa (EV) de RhIGF-I (100µg/Kg dose única) causou hipoglicemia sintomática e foi equipotente a 0,15UI/Kg de insulina (GULER *et al.*, 1987). O RhIGF-I foi menos efetivo que a insulina em reduzir os ácidos graxos livres (FFA) e só afetou os FFA imediatamente depois da injeção de RhIGF-I, quando os níveis de RhIGF-I estavam muito altos. A infusão EV contínua de RhIGF-I (24µg/Kg/h) em voluntários reduziu em 50% a concentração de peptídio-C, apesar da manutenção da euglicemia com glicose EV (BOULWARE *et al.*, 1989 citado por JONES & CLEMMONS, 1995). Nesse estudo houve aumento da captação periférica de glicose; a infusão de RhIGF-I reduziu a produção hepática de glicose e os níveis de FFA. Posteriormente, esses achados foram confirmados (TURKALJ *et al.*, 1992 citado por JONES & CLEMMONS, 1995).

A administração SC de RhIGF-I a curto prazo reduziu significativamente os níveis de TG e da relação colesterol total/HDL-colesterol, aumentou a relação insulina/peptídio-C e não causou hipoglicemia (GULER *et al.*, 1991 citado por JONES & CLEMMONS, 1995).

A resposta glicêmica ao teste oral de tolerância à glicose e ao teste de tolerância alimentar alterou-se minimamente com a infusão EV contínua de 7 e 14µg/Kg/h de RHIGF-I (ZENOBİ *et al.*, 1992). Porém, a infusão de RhIGF-I reduziu

significativamente a relação insulina/glicose após a ingesta calórica, o que sugere aumento da sensibilidade à insulina no período pós-prandial. O mecanismo deste fenômeno é desconhecido. Pode ser devido à supressão da insulina e conseqüente *up regulation* dos receptores de insulina, e do HC, com resultante perda da resistência à insulina mediada pelo HC. A supressão do glucagon pelo RhIGF-I (BOULWARE *et al.*, 1989; KERR *et al.*, 1993 citados por JONES & CLEMMONS, 1995) provavelmente contribuiu para a redução da relação insulina/glicose durante a administração do RhIGF-I. A comparação direta da resposta contra-regulatória à hipoglicemia induzida pelo RhIGF-I *versus* insulina mostrou que o RhIGF-I, comparado à insulina, suprime tanto o glucagon como a resposta do HC, e aumenta a norepinefrina e os sintomas adrenérgicos (KERR *et al.*, 1993 citados por JONES & CLEMMONS, 1995). Enquanto a administração de HC e RhIGF-I produz efeitos anabólicos e de crescimento comparáveis, os dois hormônios têm efeito oposto sobre o metabolismo da glicose e dos FFA.

GULER *et al.* obtiveram efeitos hipoglicêmicos significativos ao usar RhIGF-I por via EV (100µg/Kg/dia) (GULER *et al.*, 1992 citado por JONES & CLEMMONS, 1995).

A administração SC de RhIGF-I (40 e 80µg/Kg/dia) em adultos não produziu hipoglicemia, não alterou os níveis de insulina de jejum, mas reduziu os valores pós-prandiais de insulina em relação ao placebo (WILTON *et al.*, 1991). A absorção lenta do RhIGF-I SC deve permitir que grande parte dele se ligue às IGFBP, o que poderia explicar a ausência de hipoglicemia (WILTON *et al.*, 1991).

A administração a curto prazo de RhIGF-I causou redução dos níveis de IGF-II (GULER *et al.*, 1989; ZENOBI *et al.*, 1992).

Em adultos, a administração de RhIGF-I (7 e 14µg/Kg/dia, EV) suprimiu os níveis de HC no 2º dia de tratamento (ZENOBI *et al.*, 1992). Após o uso EV contínuo de RhIGF-I (10 ou 15µg/Kg/h) ocorreu supressão de 85% da concentração média de HC, principalmente devido à redução da amplitude dos pulsos espontâneos. Observou-se diminuição significativa da frequência dos pulsos e supressão de 82% da resposta

do HC ao GHRH (BERMANN *et al.*, 1994). Nesse estudo, o nível basal de TSH e a resposta ao TRH foram suprimidos com o uso de RhIGF-I. Os autores concluíram que o efeito do RhIGF-I sobre a secreção de HC e TSH é compatível com a estimulação da secreção hipotalâmica de SS, induzida pelo RhIGF-I.

2.2.5.2 Indivíduos catabólicos

Os efeitos anabólicos do RhIGF-I têm sido estudados em humanos em estados catabólicos. A infusão contínua EV de RhIGF-I ($12\mu\text{g/Kg/h}$) em voluntários normais em restrição calórica resultou em melhora do balanço nitrogenado, comparável ao obtido com a administração de HC (CLEMMONS *et al.*, 1992). Enquanto a administração de HC aumenta a glicemia e a insulinemia, a infusão de RhIGF-I reduz os níveis séricos de glicose e de insulina. Restrição calórica combinada com administração de RhIGF-I aumenta significativamente a incidência de hipoglicemia sintomática, sendo as doses de RhIGF-I bem toleradas em indivíduos alimentados.

Outro estudo foi realizado para avaliar a combinação de RhIGF-I ($12\mu\text{g/Kg/h}$ EV) e HC ($0,05\text{mg/Kg/dia}$) em voluntários com restrição calórica. Esta combinação hormonal não modificou os níveis séricos de peptídio-C, e a glicemia se manteve normal. A administração isolada de RhIGF-I suprimiu o peptídio-C e causou hipoglicemia sintomática em vários indivíduos. A combinação de HC e RhIGF-I resultou em retenção de N 2,4 vezes maior, ocasionando balanço nitrogenado positivo, apesar da restrição calórica (KUPFER *et al.*, 1993 citado por JONES & CLEMMONS, 1995). A infusão de IGF-I aumentou duas vezes a concentração de IGFBP-1 e 2 e diminuiu discretamente a IGFBP-3. A administração de HC reduziu minimamente os níveis de IGFBP-1, não modificou a IGFBP-2 e aumentou levemente a IGFBP-3. O uso combinado de HC/RhIGF-I diminuiu discretamente a IGFBP-1, não alterou a IGFBP-2 e elevou significativamente a IGFBP-3. A ALS aumentou com a administração de HC/RhIGF-I e diminuiu com o uso isolado de HC. Quando se combina HC/RhIGF-I, muito mais IGF-I se liga ao complexo 150Kd IGFBP do que

quando se usa o IGF-I isoladamente. Isto deve prolongar a meia vida sérica do IGF-I e pode explicar os efeitos anabólicos maiores da terapia combinada. Como o IGF-I do complexo ternário 150Kd equilibra-se lentamente com os compartimentos teciduais, o efeito da combinação de HC/IGF-I na divisão da maior parte do IGF-I do complexo 150Kd pode fornecer alguma proteção contra os efeitos hipoglicêmicos do IGF-I (YOUNG *et al.*, 1992 citado por JONES & CLEMMONS, 1995).

Outros efeitos incluem a redução do colesterol e do potássio e a melhora da função renal (GULER *et al.*, 1989; HIRSCHBERG *et al.*, 1993). A infusão de RhIGF-I aumentou a filtração glomerular e a perfusão renal. A excreção de fósforo estava diminuída e ocorreu discreto aumento da excreção protéica (HIRSCHBERG *et al.*, 1993).

2.2.5.3 Pacientes diabéticos

O uso de RhIGF-I tem sido testado em diabéticos devido aos efeitos de redução da glicemia e do aumento da sensibilidade à insulina observados em outros estudos.

Em pacientes com insulino-resistência severa, a administração EV de RhIGF-I (0,1-0,3mg/Kg dose única) ou subcutânea (0,1-0,4mg/Kg duas vezes/dia) por 12 meses provocou redução dos níveis altos de glicemia e insulina (SCHOENLE *et al.*, 1991; QUIN *et al.*, 1990; KURUYA *et al.*, 1993). A longo prazo houve decréscimo da frutossamina e HbA1c.

2.2.5.4 Síndrome de Laron

Esta síndrome se caracteriza por sinais clínicos de deficiência de HC, apesar dos níveis elevados de HC. Os valores de IGF-I são subnormais; a administração de HC não aumenta os níveis de IGF-I e não estimula o crescimento (LARON *et al.*, 1991).

A infusão EV de RhIGF-I (16µg/Kg/h) por 11 dias diminuiu a excreção urinária de N (em 47%), de fósforo (em 30%), de sódio (em 27%), aumentou a de Ca (em 2,5 vezes) e não alterou a de potássio. Diminuiu a concentração sérica de uréia nitrogenada em 56% e não alterou os níveis séricos de fósforo, Ca, sódio e potássio. O

clearance de creatinina aumentou 20%. No mesmo experimento ocorreu redução dos níveis de insulina, peptídio-C e glicemia de jejum (WALKER *et al.*, 1991).

O uso SC de 120 ou 150µg/Kg/dia de RhIGF-I produziu hiperglicemia pós-prandial, atribuída à supressão da secreção de insulina (WALKER *et al.*, 1991) e ao fato de que o IGF-I é menos efetivo que a insulina em dispor de uma carga de glicose e em suprimir a produção hepática de glicose (JACOB *et al.*, 1989). Nesse estudo ocorreram redução do colesterol sérico e pequena variação dos TG (LARON *et al.*, 1991).

A administração de RhIGF-I (40µg/Kg/dose de 12/12h, SC) diminuiu os níveis pós-prandiais de insulina e aumentou a excreção urinária de cálcio (VACCARELLO *et al.*, 1993). O tratamento de uma criança por nove meses com RhIGF-I (120µg/Kg duas vezes/dia, SC) quase dobrou a VC, sem provocar hipoglicemia (WALKER *et al.*, 1992). A administração aguda de RhIGF-I (75µg/Kg, EV) causou hipoglicemia e redução da insulina em nove pacientes estudados (LARON *et al.*, 1988). O tratamento de cinco crianças pré-púberes por dez meses com RhIGF-I quase triplicou a VC; hipoglicemia ocorreu apenas no paciente mais jovem e foi assintomática (LARON *et al.*, 1992).

A secreção de HC foi inibida pela infusão contínua de RhIGF-I (2 a 24µg/Kg/h) e aumentou prontamente após a parada da medicação (WALKER *et al.*, 1991). O mesmo ocorreu com a administração de RhIGF-I (120 ou 150µg/Kg/dia) SC por 7 dias (LARON *et al.*, 1991). O uso de RhIGF-I (40µg/Kg/dose de 12/12h, SC) suprimiu a concentração integrada média de HC de 24h, bem como o número de picos, a AUC e a secreção de HC estimulada pela clonidina (VACCARELLO *et al.*, 1993). A supressão da secreção de HC pode ser consequência do efeito inibitório direto do IGF-I sobre os somatotrofos hipofisários (NAMBA *et al.*, 1989), ou da ação indireta envolvendo o estímulo da secreção hipotalâmica de SS (BERELOWITZ *et al.*, 1981). O estímulo da secreção de SS mediada pelo IGF-I também pode ser responsável por suprimir a secreção de insulina.

O tratamento prolongado com RhIGF-I (120µg/Kg, 2 vezes ao dia, SC) reduziu o nível médio e suprimiu a pulsatilidade do HC (COTTERILL *et al.*, 1993).

A concentração de IGF-II correlacionou-se inversamente com os níveis de IGF-I durante o uso de RhIGF-I via SC e EV (WALKER *et al.*, 1991; VACCARELLO *et al.*, 1993). A IGFBP-2 aumentou 45% após a medicação e a IGFBP-3 não sofreu influência significativa (VACCARELLO *et al.*, 1993).

2.2.5.5 Efeitos adversos do uso de RhIGF-I

Há relatos de aumento doloroso de parótidas, paralisia de Bell, edema periférico, cefaléia, taquicardia e hipoglicemia (JONES & CLEMMONS, 1995).

2.2.6 Farmacocinética do RhIGF-I

O perfil farmacocinético do RhIGF-I foi estudado em voluntários normais (WILTON *et al.*, 1991). Após dose única de RhIGF-I SC (40 e 80µg/Kg), a concentração sérica média do IGF-I aumentou para 150 e 245ng/ml, respectivamente. A absorção do RhIGF-I foi lenta; a concentração máxima de IGF-I foi atingida após 7 horas com dose única e após 3,5 horas com múltiplas doses. No período de injeções diárias repetidas de 40µg/Kg, os níveis de IGF-I estiveram sempre 150ng/ml acima do valor basal. Outras variáveis farmacocinéticas, como clearance, volume de distribuição e meia vida de eliminação, não foram diferentes após injeções isoladas ou repetidas. Após a última aplicação, a concentração de IGF-I retornou aos valores pré-tratamento, indicando que uma semana de injeções diárias repetidas de RhIGF-I não altera a produção endógena de IGF-I. A biodisponibilidade da droga foi de 100%. Considerando que a farmacocinética do RhIGF-I é a mesma do IGF-I endógeno, foi possível estimar a taxa de produção endógena. Obteve-se um valor em torno de 40µg/Kg, que corresponde a aproximadamente 3mg/dia, diferente do valor relatado anteriormente de 10mg/dia (GULER *et al.*, 1987).

A administração EV de RhIGF-I (7 e 14µg/Kg/h, por 2 dias) em adultos normais mostrou que 10 horas após o início da infusão os níveis de IGF-I total e livre estavam aumentados. No 2º dia (7µg/Kg/h) a concentração de IGF-I total e livre foi 3,9 e 1,8 vezes maiores que o basal, respectivamente. No 2º dia (14µg/Kg/h) os níveis de

IGF-I total e livre foram 4,4 e 4,1 vezes maior que os valores basais, respectivamente (ZENOBİ *et al.*, 1992).

A farmacocinética do RhIGF-I também foi avaliada em pacientes com síndrome de Laron, após a administração de 40µg/Kg a cada 12 horas, SC (VACCARELLO *et al.*, 1993). A concentração média de IGF-I pré-tratamento foi de 19% dos controles. O pico de IGF-I foi atingido 2 a 6 horas após a primeira injeção. Do 1º ao 7º dia de uso da medicação não houve modificações da meia vida e do clearance metabólico, mas o volume de distribuição aumentou. Doze horas após a 1ª injeção a concentração de IGF-I estava três vezes maior que o valor basal. Os níveis de IGF-I estavam duas vezes maiores que os valores pré-tratamento 48 horas após a última aplicação (VACCARELLO *et al.*, 1993).

3 PACIENTE E MÉTODOS

3.1 PACIENTE

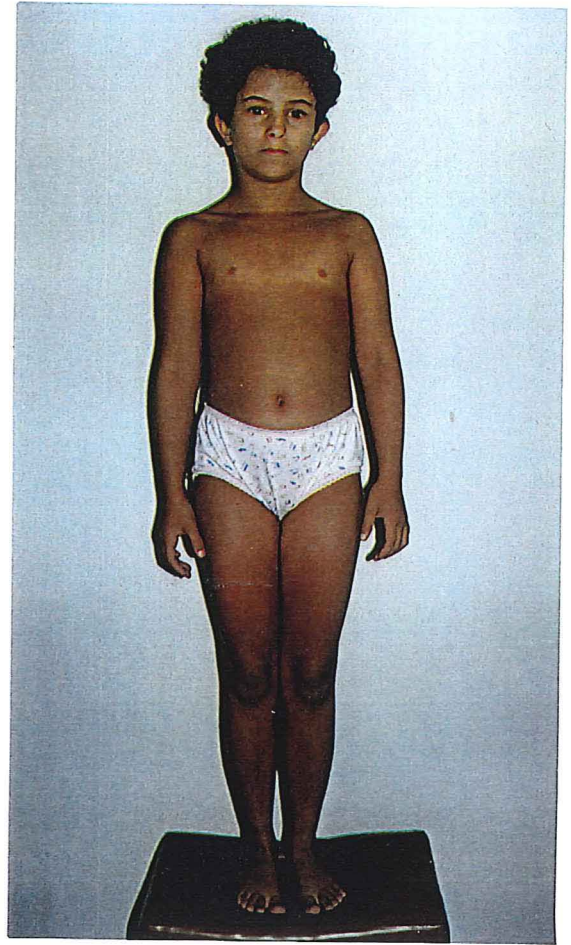
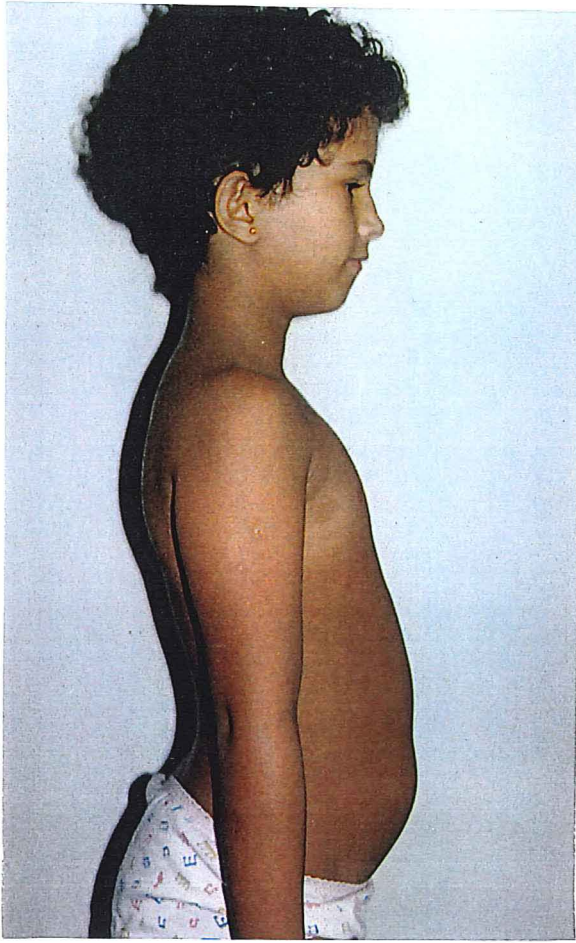
A paciente nasceu de parto normal, a termo, sem intercorrências. Ao nascimento pesou 2.070g e mediu 42cm. Apresentou atraso do desenvolvimento psicomotor. É a segunda filha de um casal não consanguíneo, que possui dois outros filhos saudáveis. O pai tem 165cm de altura e a mãe 160cm. Na época de seu nascimento, o pai e a mãe tinham 29 e 25 anos de idade. Não há casos semelhantes na família. As condições sócio-econômicas da família são boas.

Procurou o Serviço de Endocrinologia Pediátrica por baixa estatura, observada desde o nascimento, com 5,1 anos. A história clínica não mostrou doença sistêmica ou alterações nutricionais que pudessem contribuir para o retardo de crescimento. Ao exame apresentou: estatura 87,2cm, escore-Z da estatura (H-SDS) de - 4,3, peso 11,1Kg (4Kg abaixo do 3º percentil), circunferência craniana no 2º desvio padrão (DP) negativo e proporções corporais normais. Possui face discretamente triangular e assimétrica, orelhas antevertidas, implantação dentária defeituosa e palato ogivóide. Havia aumento da deposição abdominal de gordura e manchas café com leite no pescoço, dorso e membros. A textura da pele era normal. A palpação da tireóide estava normal. Era pré-púbere. Estava alerta e ativa (figuras 1a, 1b e 1c).

Exames laboratoriais de rotina, incluindo hemograma, VHS, glicemia, sódio, potássio, cloro, bicarbonato, cálcio, fósforo, fosfatase alcalina, uréia, creatinina, parcial de urina, bilirrubina e transaminases estavam normais.

A idade óssea (Greulich & Pyle) era de 30 meses; RX de esqueleto, eletrocardiograma, ecocardiograma e eletroencefalograma estavam normais. O QI (WISC-III) era de 53.

FIGURAS 1A, 1B E 1C - FOTOS DA PACIENTE NA ÉPOCADA REALIZAÇÃO DO ESTUDO



A avaliação hormonal mostrou: T3 (160ng/dl), T4 (11µg/dl), TSH (4,9mUI/L), cortisol (15µg/dl) e prolactina (27, 13 e 6,0ng/ml em diferentes ocasiões) normais. Os valores máximos de HC após estímulo com clonidina foi 19,2ng/ml e após hipoglicemia insulínica 34ng/ml. As dosagens basais e após RhGH (0,1UI/Kg/dia, SC, por 4 dias) de IGF-I e IGFBP-3 foram: 331 e 301 µg/L; 4,3 e 3,9 µg/ml, respectivamente, correspondentes ao 2º DP positivo para a idade óssea (BLUM *et al.*, 1993).

O cariótipo de alta resolução mostrou 46, Xxr (15) (p11q26.2) (figura 2). A análise quantitativa por *southern blot*, realizada em DNA extraído de linfócitos periféricos e de fibroblastos, foi compatível com a ausência de uma cópia do gene do IGF-I R1 (figura 3). O RNAm do IGF-I R1 foi quantificado por um ensaio de solução de hibridização nuclease protegido: os níveis de RNAm foram 50% dos valores dos controles (figura 4) (LOWE *et al.*, 1987). Os fibroblastos foram obtidos de biópsia de pele da paciente e da mãe. Os fibroblastos de pele de doador normal foram obtidos do NIGMS Human Genetic Mutant Cell Repository, Coriell Institute for Medical Research (Camden, NJ). O número e a idade do doador são GM09503 e 10 anos, respectivamente (SIEBLER *et al.*, 1995). Os cariótipos dos pais foram normais.

FIGURA 2 - CARIÓTIPO DE ALTA RESOLUÇÃO



FIGURA 3 - ANÁLISE DO DNA DO RECEPTOR DE IGF-I POR SOUTHERN BLOT

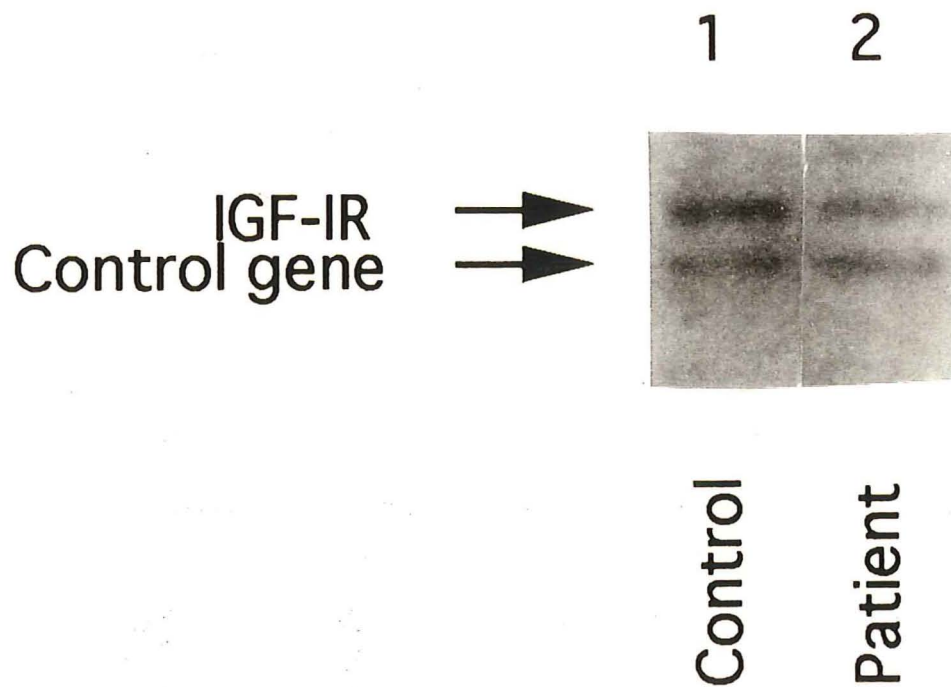
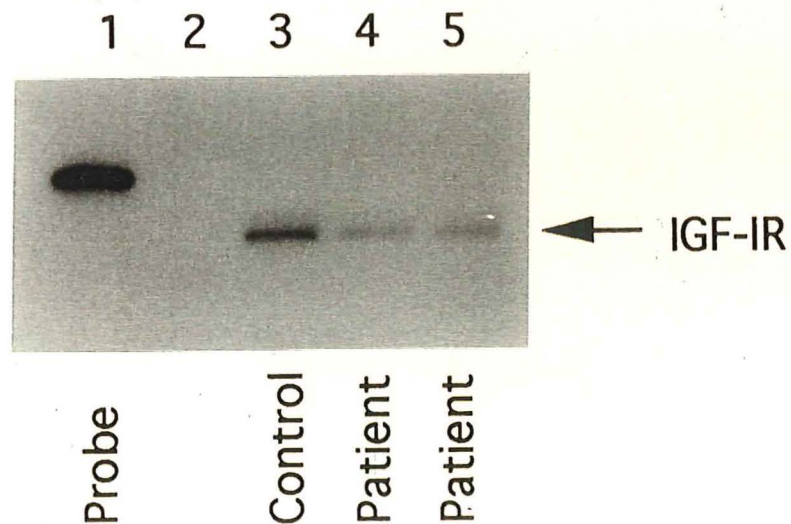


FIGURA 4 - ANÁLISE DO RNA DO RECEPTOR DE IGF-I POR NORTHERN BLOT

SOLUTION HYBRIDIZATION
RNASE PROTECTION ASSAY



A paciente foi acompanhada ambulatorialmente por 21 meses. Com 6,8 anos iniciou RhGH (1,0UI/Kg/semana, SC, dividido em 7 doses iguais), interrompendo 4 meses após. Com 7,8 anos reiniciou RhGH (1,0UI/Kg/semana nos primeiros 5 meses e depois 0,85UI/Kg/semana nos 5 meses seguintes). Dos 8,7 aos 9,1 anos recebeu RhGH (0,85UI/Kg/semana) associado à oxandrolona (0,0625mg/Kg/dia, VO). De 9,1 a 9,7 anos usou apenas oxandrolona (0,0625mg/Kg/dia). Dos 9,7 aos 11,5 anos não recebeu medicação (figura 5).

A VC basal era de 4,2cm/ano, escore-Z da VC (HV-SDS) de -2,1. Durante o uso do RhGH passou para 6,3 (HV-SDS = 1,0). Em vigência de RhGH e oxandrolona foi de 9,2 (HV-SDS = 4,8). Com a oxandrolona isoladamente 5,4 (HV-SDS = 0). Sem medicação diminuiu para 4,0 (HV-SDS = -1,7) (figuras 6 e 7).

A idade cronológica (IC), a idade óssea (IO) e o escore-Z da estatura (H-SDS) antes, durante e após o tratamento estão na tabela 1. Observa-se que durante o uso de RhGH e oxandrolona ou oxandrolona isoladamente houve avanço da IO.

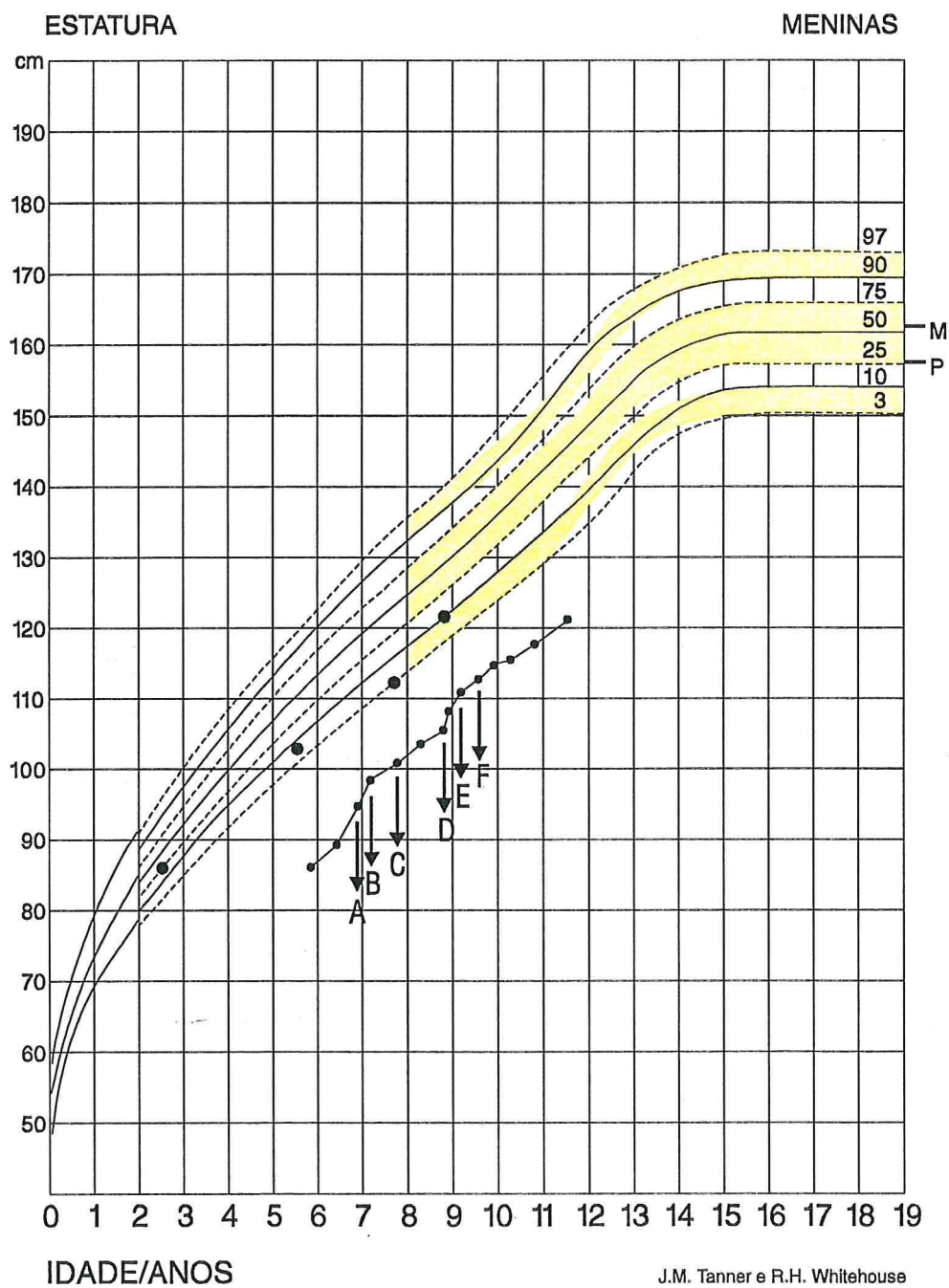
TABELA 1 - IDADE CRONOLÓGICA (IC), IDADE ÓSSEA (IO) E ESCORE-Z DA ESTATURA (H-SDS)

IC (anos)	IO (G&P)	H-SDS
5,1	2,5	-4,3
8,1	5,5	-3,8
⁽¹⁾ 8,9	5,7	-3,5
⁽¹⁾ 9,1	7,8	-3,3
⁽²⁾ 9,7	8,2	-3,3
10,9	8,5	-3,3
11,5	8,9	-3,2

(1) Durante o tratamento com RhGH e RhGH associado à oxandrolona.

(2) Durante o tratamento com oxandrolona.

FIGURA 5 - GRÁFICO DE CRESCIMENTO



De A até B recebeu RhGH
 De C até D recebeu RhGH
 De D até E recebeu RhGH e Oxandrolona
 De E até F recebeu Oxandrolona

FIGURA 6 - GRÁFICO DA VELOCIDADE DE CRESCIMENTO (VC)

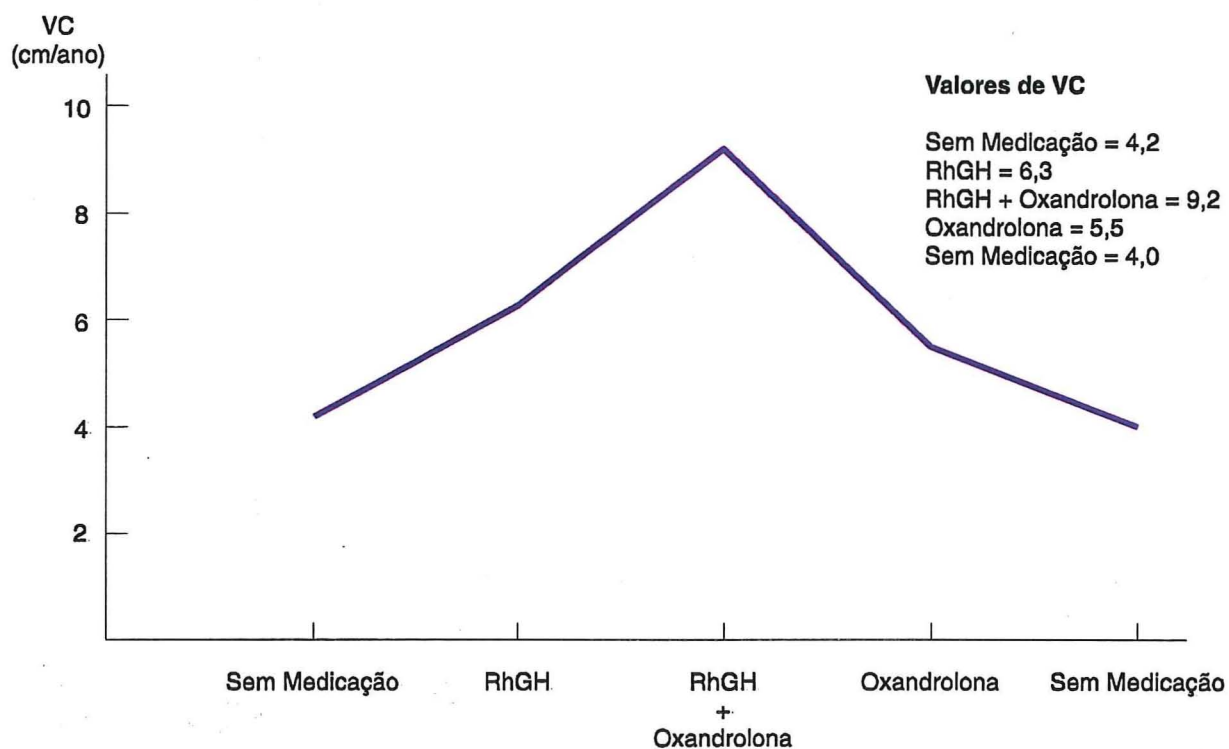
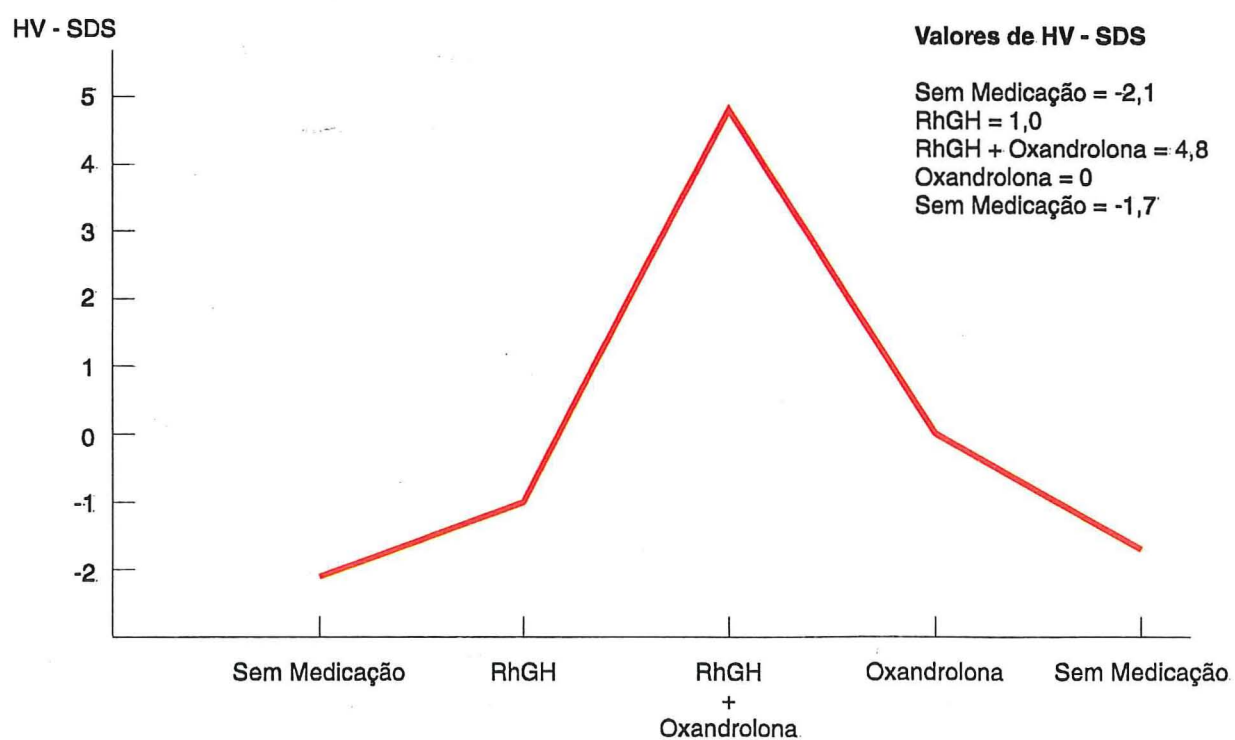


FIGURA 7 - GRÁFICO DO ESCORE - Z DA VELOCIDADE DE CRESCIMENTO (HV - SDS)



3.2 MÉTODOS

O protocolo de estudo foi executado no Departamento de Pediatria do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, após aprovação do Comitê de Ética do Hospital e consentimento por escrito dos pais (Anexos 1 e 2).

Foi realizado quando a paciente estava com 10,9 anos de idade. Ela foi hospitalizada em quarto individual, acompanhada pela mãe.

O experimento foi dividido em duas fases: fase A (duração de 3 dias) e fase B (15 dias), com intervalo de 15 dias entre cada fase.

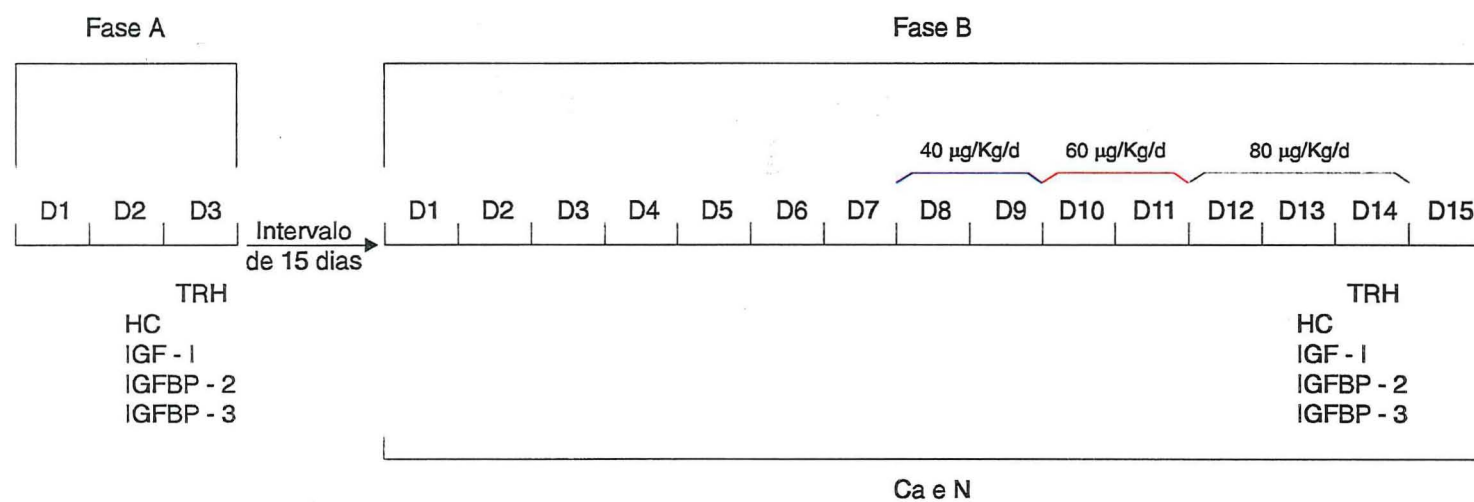
3.2.1 Fase A

- Internamento no dia 1.
- Instalação de cateter heparinizado EV, ligado a um sistema de sucção contínua às 20h do dia 2.
- Início da coleta de amostras às 21h do dia 2, estendendo-se por 12 horas contínuas até às 9h do dia 3.
- Retirada do cateter e introdução de *scalp* para teste do TRH às 9h do dia 3.
- Obtenção de amostras sanguíneas a cada 6 horas por um período de 24 horas para dosagens de IGF-I, IGFBP-2 e IGFBP-3 (das 8h do dia 2 às 8h do dia 3).
- Alta hospitalar às 15h do dia 3.

3.2.2 Fase B

- Coleta de urina de 24h do dia 1 ao dia 15.
- Do dia 8 ao dia 14 recebeu RhIGF-I, SC, às 8h e às 16h, na dose de 40µg/Kg (dias 8 e 9); 60µg/Kg (dias 10 e 11) e 80µg/Kg (dias 12, 13 e 8h do dia 14).
- A glicose sanguínea capilar foi monitorizada do dia 8 ao dia 14.
- No dia 13, instalação de cateter heparinizado EV conectado ao sistema de sucção contínua às 20h e início da coleta às 21h, como na fase A.
- Retirada do cateter às 9h do dia 14.
- Colocação de *scalp* às 9h do dia 14 para teste do TRH.
- Coleta de amostras sanguíneas, a cada 6 horas, para dosagem de IGF-I, IGFBP-2 e IGFBP-3 das 8h do dia 13 às 8h do dia 14.
- Alta hospitalar no dia 15 às 8h.

FIGURA 8 - ESQUEMATIZAÇÃO DO PROTOCOLO



3.2.3 Dieta

Dieta livre na fase A. Na fase B a paciente recebia diariamente três refeições e três lanches, escolhidos de acordo com a anamnese alimentar.

Nos três primeiros dias de internação, todos os alimentos oferecidos foram pesados pela mãe, com auxílio de nutricionista. No período restante da internação, somente pela mãe já treinada. Os dados foram registrados em fichas próprias, preenchidas diariamente pela mãe (Anexo 3).

Alimentos de composições conhecidas eram oferecidos separadamente, pesados previamente. As sobras eram pesadas e descontadas do total oferecido. Assim, pode-se estimar a ingesta diária de N, Ca e o valor calórico.

A quantidade de N ingerido foi obtida pela fórmula:

$$\frac{\text{Conteúdo protéico da dieta (g)}}{6,25} = \text{Conteúdo nitrogenado da dieta (g)}$$

A composição dos alimentos (glicídios, protídios, lipídios e cálcio) foi calculada por tabelas de composição. As calorias foram determinadas a partir da quantidade de glicídios (g) x 4cal, proteínas (g) x 4cal e lipídios (g) x 9cal.

Os alimentos foram pesados em balança eletrônica analítica, com capacidade de 0,01g a 5000g, colocada no quarto, exclusivamente para a paciente. Foram usadas embalagens plásticas descartáveis para a pesagem.

Técnica de pesagem dos alimentos:

- Ligar a balança.
- Zerar a balança.
- Pesar a embalagem do alimento (quando houver), vazia.
- Anotar o peso da embalagem.
- Desligar a balança.
- Colocar o alimento na embalagem.

- Religar a balança.
- Zerar a balança novamente.
- Registrar o peso em ficha própria.
- Desligar a balança.
- Após oferecer o alimento, pesar a sobra (quando houver).
- Registrar a sobra.

3.2.4 Coleta do Material

Teste do TRH: administração de TRH em jejum (200 μ g EV) proveniente da Universidade Federal de São Paulo; obtenção de soro nos tempos 0, 15, 30, 45 e 60 minutos para dosagem de TSH. Utilização de *scalp* heparinizado número 21 em veia de antebraço.

Instalação de cateter heparinizado (*Carmeda*, Estocolmo, Suécia) em veia de antebraço, conectado a um sistema de sucção contínua (*Pump Conflo*, Gotemburgo, Suécia). Tubos com EDTA eram trocados a cada 20 minutos para obtenção de plasma para dosagem de HC, totalizando 36 amostras (12 horas de coleta).

Obtenção de amostras de soro a cada 6 horas para determinação de IGF-I, IGFBP-2 e IGFBP-3 por período de 24 horas (4 amostras).

Coleta de urina de 24h diariamente na fase B, anotação do volume e separação de amostras para armazenamento.

Todas as amostras das fases A e B foram armazenadas a -20°C e analisadas em conjunto.

3.2.5 Dosagens Laboratoriais

Dosagens urinárias (N, Ca e creatinina) foram realizadas por técnicas automatizadas padrões.

O TSH foi dosado por ensaio imunoenzimático ultra-sensível (Laboratório Abbott). Os coeficientes de variação (CV) inter-ensaio para amostra contendo 6,10 e 28,61 μ UI/ml foram 3,25 e 3,94%, respectivamente. Os CV intra-ensaio para os

mesmos valores foram 3,4 e 4,4%, respectivamente. A sensibilidade do método é de 0,02 μ UI/ml.

O HC foi dosado por RIE, utilizando anticorpos monoclonais (*Tandem-R HGH, Hybritech, San Diego, Calif.*). O limite de detecção do método é de 0,5 ng/ml (GENENTECH COLLABORATIVE STUDY GROUP, 1989).

O IGF-I foi medido por RIE (COPELAND *et al.*, 1980), após a separação do IGF-I das IGFBP por extração ácido-etanólica (DAUGHADAY *et al.*, 1980). Os CV inter e intra-ensaios foram 8,4% e 3,0%, respectivamente. O IGF-I foi separado das IGFBP usando-se cartuchos de octadecasilyl-silica (*C18 Sep-Pak, Waters Associates, Milford, MA*) (DAVENPORT *et al.*, 1988). Os valores de referência de IGF-I são expressos no intervalo de confiança de 95%. Os CV inter e intra-ensaio são ambos de 6%. Em estudos comparativos de 128 amostras de soro com concentrações de IGF-I variando de <50 a >800 μ g/L, observou-se que a correlação (r) entre as amostras extraídas por ácido-etanol e as cromatografadas com sílica-C18 é de 0,9286 (inclinação 1,03; intercepção Y 4,43 μ g/L) (SMITH *et al.*, 1993).

A IGFBP-2 foi dosada por RIE (CLEMMONS *et al.*, 1991), usando-se anti-soro (BOURNER *et al.*, 1992) produzido contra IGFBP-2 bovino purificado de meio de cultura de células MDBK (COHIC & CLEMMONS, 1991). Este anti-soro se liga à 50% de uma quantidade traçadora de IGFBP-2 humano na diluição de 1:50000, e tem menos de 1% e 0,01% de reação cruzada com IGFBP-1 e IGFBP-3 humanas, respectivamente. O IGFBP-2 humano usado para a iodação foi purificado de meio de cultura de uma linhagem celular obtida de glioblastoma humano (BOURNER *et al.*, 1992), sendo sua homogeneidade confirmada por eletroforese em gel de *sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide* corado com prata e por análise de composição de aminoácidos. *Immunoblotting* do soro humano com o antisoro de IGFBP-2 mostrou uma banda única de peso molecular 34 KD correspondendo à migração antecipada da IGFBP-2. Os CV inter e intra-ensaios foram 11% e 5%, respectivamente.

A IGFBP-3 foi medida por RIE de duplo anticorpo, semelhante ao usado para a IGFBP-2. O anti-soro anti-IGFBP-3 foi preparado com IGFBP-3 humana (CAMACHO-HUBNER *et al.*, 1992). Este anti-soro, com reação cruzada menor que

0,1% com IGFBP-1 e IGFBP-2 humanas, foi usado na diluição final de 1:10000. A IGFBP-3 empregada foi obtida da Genentech. Trabalhou-se com um produto iodado com atividades específicas que variavam de 30 a 40 μ Ci/ μ g. O limite inferior de detecção do ensaio é 0,5ng/ml. Os CV inter e intra-ensaios foram 11% e 6%, respectivamente.

As dosagens de HC, IGF-I, IGFBP-2, IGFBP-3, creatinina, cálcio e nitrogênio urinários foram realizadas na Universidade da Carolina do Norte, Chapel Hill, EUA.

3.2.6 Monitorização da Glicemia

As dosagens de glicose (Glucometer Elite) foram feitas em sangue obtido por punção digital, antes de cada refeição, às 24h e às 3h, durante o período de tratamento com RhIGF-I.

3.2.7 Medicação (RhIGF-I)

Foi utilizado o RhIGF-I (*Igef*, 2mg/ml) sintetizado pela Pharmacia-Upjhon (Estocolmo, Suécia), via SC.

3.2.8 Tratamento Estatístico

Por razões éticas não foi aplicado o protocolo em um grupo controle pareado por sexo e idade. Os resultados obtidos foram comparados aos descritos em pacientes com síndrome de Laron e em adultos normais.

Para análise da secreção de HC foi empregado o programa de computador “Pulsar”, descrito previamente (MERRIAN & WACHTER, 1982). A taxa de secreção de HC de 24h foi calculada por análise de deconvolução (ALBERTSSON-WIKLAND *et al.*, 1989).

O teste *t* de Student para dados emparelhados foi empregado para a análise dos resultados do HC. O nível de significância foi de 5%.

Para o TSH considerou-se significativo qualquer valor diferente de 3 vezes o CV inter-ensaio. Para o cálculo da AUC foi utilizada integração numérica polinomial.

4 RESULTADOS

4.1 HORMÔNIO DE CRESCIMENTO

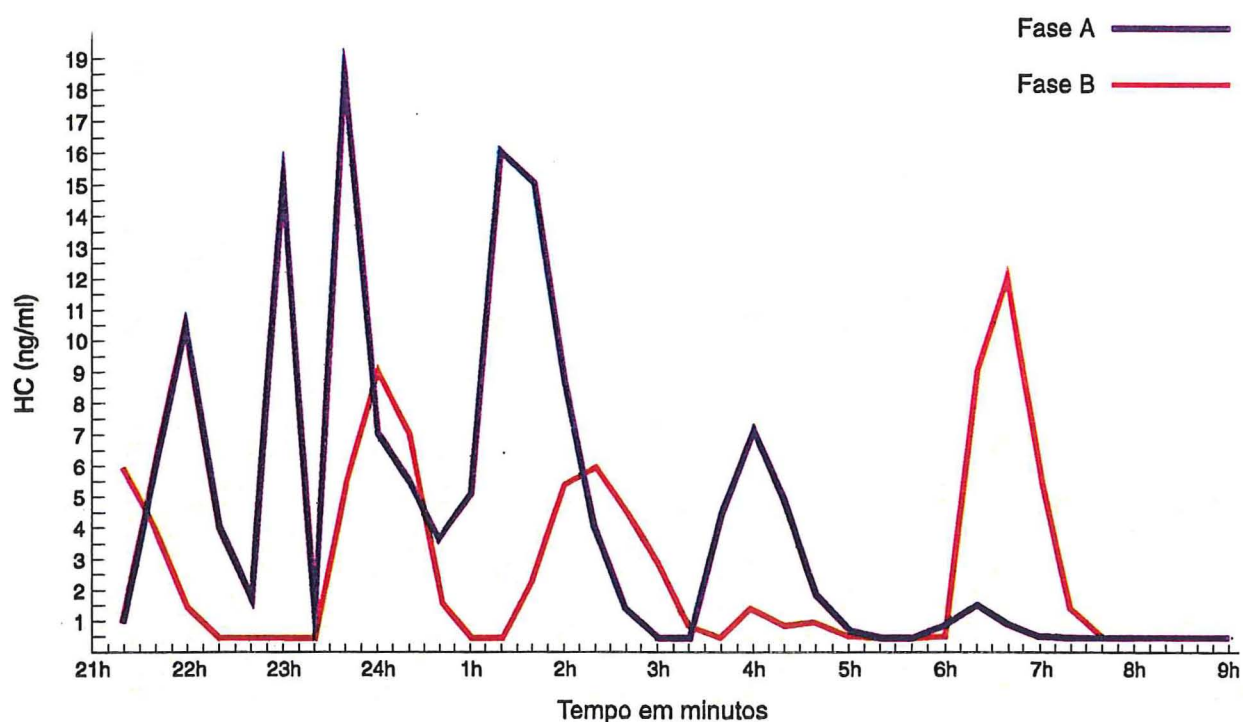
Os dados obtidos no “Pulsar” estão na tabela 2. Com a administração de RhIGF-I houve redução de apenas 30% da área sob a curva (AUC), de 30% da taxa de secreção de HC, de 25% da amplitude média dos picos, de 33% do número de picos, de 27% da altura dos picos e de 37% da concentração média de HC. O pico máximo (12,20 ng/ml) após o RhIGF-I foi 34% menor que o pico máximo antes da medicação (18,50 ng/ml).

A diferença das médias dos valores de HC entre as fases A e B não é estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

TABELA 2 - SECREÇÃO PULSÁTIL DE HC DURANTE 12 HORAS NAS FASES A E B

HC	FASE A	FASE B
Número de picos	6	4
Amplitude média dos picos (ng/ml)	10,33 ± 2,98	7,75 ± 1,52
Altura média dos picos (ng/ml)	11,45 ± 3,17	8,30 ± 1,52
Intervalo médio entre os picos	1,67 ± 0,38	3,11 ± 0,44
Frequência dos picos	0,51429	0,34286
Concentração média (ng/ml)	4,23 ± 5,06	2,66 ± 3,09
Concentração máxima (ng/ml)	18,50	12,20
Concentração mínima (ng/ml)	0,50	0,50
AUC (ng/ml/12h)	103,85	63,39
Taxa de secreção (U/24h)	0,42	0,25

FIGURA 9 - GRÁFICO DA SECREÇÃO ESPONTÂNEA DE HC



4.2 TSH

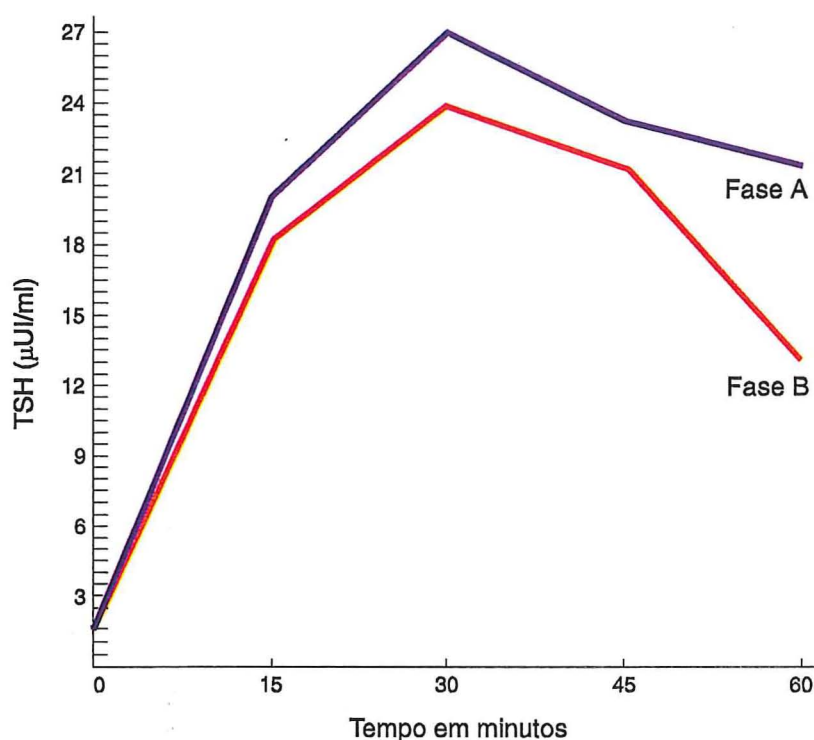
Os valores de TSH encontram-se na tabela 3.

A concentração média do TSH foi de $18,65\mu\text{UI/ml}$ na fase A e $15,54\mu\text{UI/ml}$ na fase B (redução de 16,6%). A AUC na fase B foi 12% menor que na fase A.

TABELA 3 - VALORES DE TSH ($\mu\text{UI/ml}$) NO TESTE DO TRH

TEMPO (em min.)	FASE A	FASE B
0	1,5	1,6
15	20,2	18,0
30	26,9	23,9
45	23,3	21,2
60	21,3	13,0
Média \pm DP	$18,6\pm 9,9$	$15,5\pm 8,8$
AUC	1252,8	1096,5

FIGURA 10 - GRÁFICO DOS VALORES DE TSH NO TESTE DO TRH



4.3 IGF-I, IGFBP-2 E IGFBP-3

Os valores de IGF-1, IGFBP-2 e IGFBP-3 estão na tabela 4.

O nível médio de IGF-I na fase A (374,2 ng/ml) foi maior que a média encontrada em crianças normais com idade óssea semelhante à da paciente (204 ng/ml) (UNDERWOOD & VAN WYK, 1991). Durante a administração de RhIGF-I os valores de IGF-I quase triplicaram (média de 959,2 μg/L).

A concentração média de IGFBP-2 na fase A (127,7 mg/ml) estava normal para a idade óssea (140-240 mg/ml) (SMITH *et al.*, 1993). Permaneceu normal na fase B (164,7 mg/ml). A relação IGFBP-2/IGF-I foi 0,3 na fase A e 0,17 na fase B.

O valor médio de IGFBP-3 na fase A (4,5 μg/ml) estava elevado para a idade (1,7 a 3,8 μg/ml) (SMITH *et al.*, 1993) e houve tendência à elevação na fase B (5,4 μg/ml).

TABELA 4 - VALORES DE IGF-I, IGFBP-2 E IGFBP-3 NAS FASES A E B

HORAS	IGF-I ($\mu\text{g/L}$)		IGFBP-2 (mg/ml)		IGFBP-3 ($\mu\text{g/ml}$)	
	Fase A	Fase B	Fase A	Fase B	Fase A	Fase B
8	386	765	136	135	4,8	6,1
13	372	1090	121	141	4,4	5,9
20	380	1133	125	186	4,2	4,9
2	359	849	129	197	4,5	4,8
Média \pm DP	374,2 \pm 10,1	959,2 \pm 155,9	127,7 \pm 5,5	164,7 \pm 27,1	4,5 \pm 0,22	5,4 \pm 0,58

4.4 Ca E N URINÁRIOS

A ingesta de N, volume urinário, creatinina urinária, Ca e N urinários estão nas tabelas 5 e 6.

Durante o uso de RhIGF-I, a média de volume urinário e a média de creatinina apresentaram redução de 28 e 18%, respectivamente.

No período de uso do RhIGF-I, a média da excreção urinária de Ca foi 60% maior. O aumento ocorreu especialmente nos dias 13 e 14, quando a paciente recebeu a dose máxima do RhIGF-I.

A média da ingesta de N foi 14% menor e a média de excreção de N foi 20% menor durante o uso do RhIGF-I.

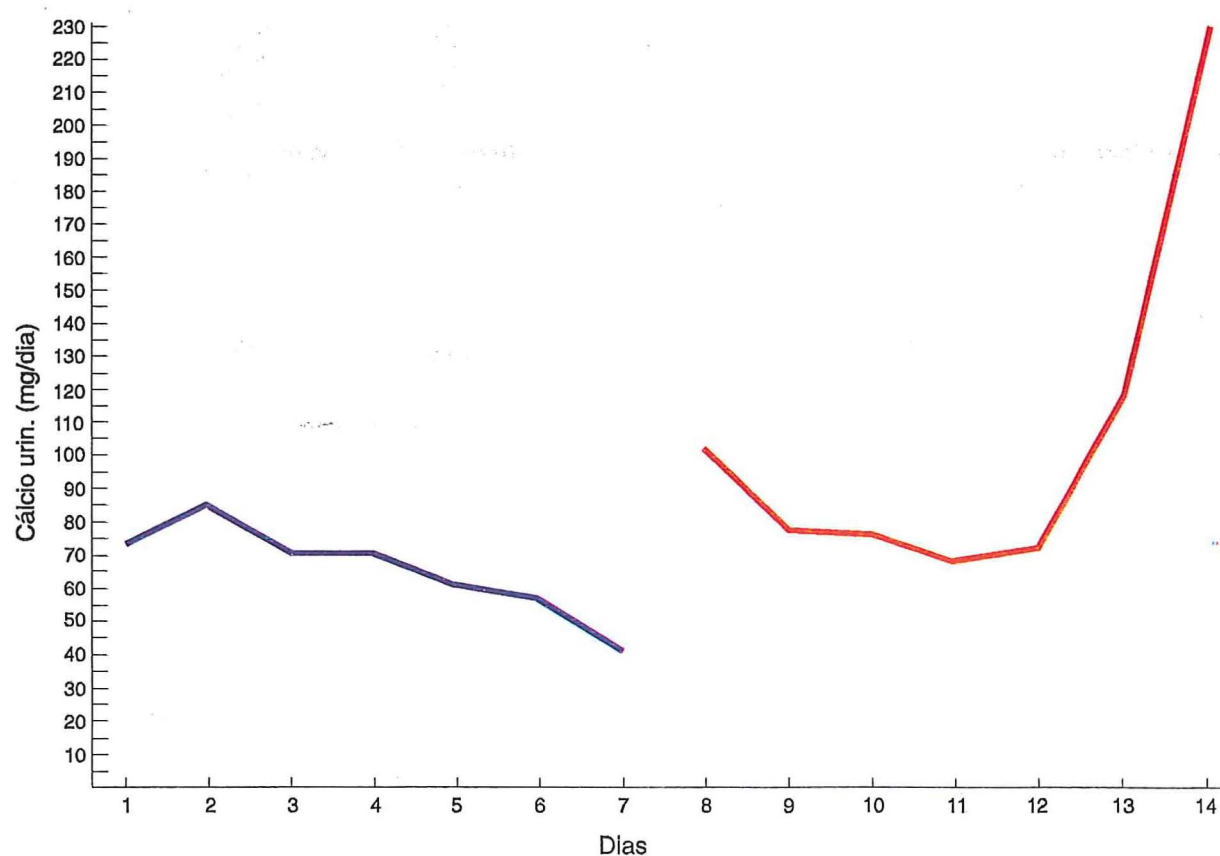
TABELA 5 - VOLUME URINÁRIO DE 24 HORAS, INGESTA DE N, EXCREÇÃO DE CREATININA, N E Ca NA FASE B, ANTES DO USO DE RhIGF-I

DIA	VOLUME (ml)	INGESTA DE N (mg/d)	CREATININA (mg/d)	N (mg/d)	Ca (mg/d)
1	710	4880	419	3337	72
2	780	5830	413	3861	85
3	600	4320	354	3150	70
4	750	4370	413	3788	71
5	420	4050	433	4284	61
6	450	3920	329	2993	57
7	600	4870	288	2340	42
Média		4606	378	3393	65
DP		653	55	645	14
EP			20,8	243,7	5,3

TABELA 6 - VOLUME URINÁRIO DE 24 HORAS, INGESTA DE N, EXCREÇÃO DE CREATININA, N E Ca NA FASE B, DURANTE O USO DE RhIGF-I

DIA	VOLUME (ml)	INGESTA DE N (mg/d)	CREATININA (mg/d)	N (mg/d)	Ca (mg/d)
8	430	3620	469	4042	96
9	450	4480	302	2813	78
10	510	4440	344	2943	76
11	380	3140	281	2470	68
12	410	3680	217	2763	72
13	580	4240	302	2465	117
14	320	4160	259	2532	229
Média		3966	280	2434	112
DP		497	47	424	68
EP		188	21	189,6	30,4

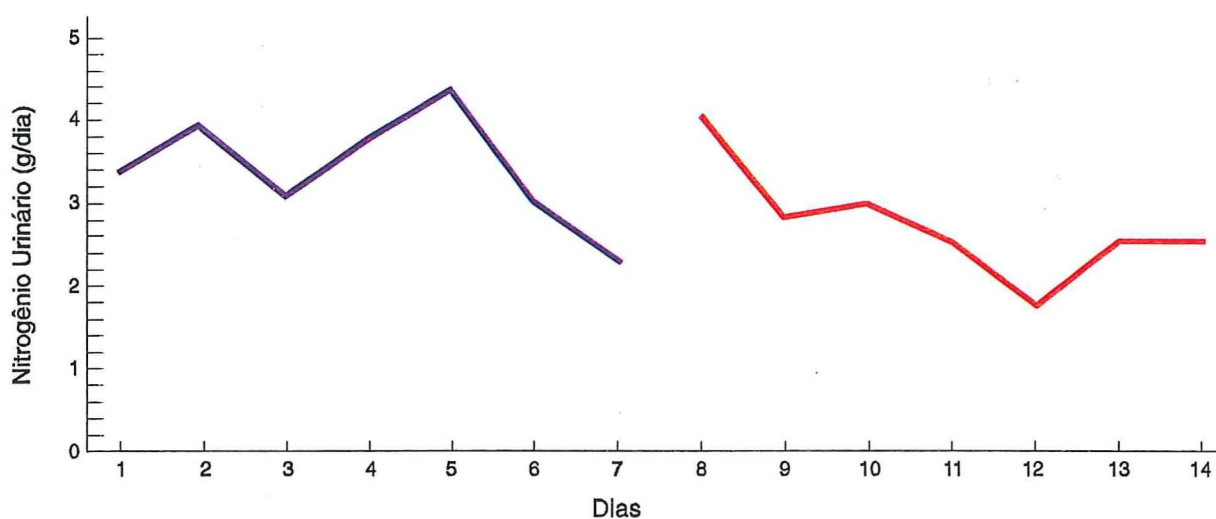
FIGURA 11 - GRÁFICO DA EXCREÇÃO URINÁRIA DE CÁLCIO



Período basal do dia 1 ao 7

Período de administração de RhIGF-I do dia 8 ao 14

FIGURA 12 - GRÁFICO DA EXCREÇÃO URINÁRIA DE NITROGÊNIO



Período basal do dia 1 ao 7

Período de administração de RhIGF-I do dia 8 ao 14

4.5 GLICOSE

Durante o uso do RhIGF-I houve dois episódios assintomáticos de hipoglicemia (ambos de 42mg/dl). Ocorreram no 4º dia de administração do RhIGF-I, com a dose de 60µg/Kg, às 24h e às 3h.

TABELA 7 - VALORES DE GLICEMIA (mg/dl) DURANTE A ADMINISTRAÇÃO DE RhIGF-I

DIA	ANTES DO DESJEJUM	ANTES DO ALMOÇO	ANTES DO JANTAR	ÀS 24h	ÀS 3h
Dia 8	96	95	116	75	100
Dia 9	55	69	107	107	70
Dia 10	92	107	107	107	108
Dia 11	89	112	105	42	42
Dia 12	103	149	120	93	102
Dia 13	96	102	107	129	117
Dia 14	87	119	115	94	99

4.6 SINAIS E SINTOMAS ADVERSOS

Não ocorreu hipoglicemia sintomática ou qualquer outro efeito adverso com o uso do RhIGF-I.

5 DISCUSSÃO

5.1 HORMÔNIO DE CRESCIMENTO

Com a administração de RhIGF-I, houve supressão parcial da secreção de HC, com redução da AUC (30%), taxa de secreção (30%), amplitude dos picos (25%), número de picos (33%), altura dos picos (27%) e concentração total de HC (37%).

LARON *et al.* observaram redução de 88% da concentração sérica de HC durante o tratamento com RhIGF-I em 10 pacientes com síndrome de Laron, na dose de 120 a 150µg/Kg/dia, SC (LARON *et al.*, 1991).

WALKER *et al.*, ao estudarem uma criança de 9,7 anos com síndrome de Laron, observaram supressão de 70% da média dos valores de HC de jejum dos primeiros 12 dias e de 96% 6 horas após a administração SC de RhIGF-I, 120µg/Kg, duas vezes ao dia (WALKER *et al.*, 1992).

VACCARELLO *et al.* obtiveram supressão de 85% da concentração média de HC de 24h com o uso de 40µg/Kg de RhIGF-I, SC, a cada 12 horas, em seis adultos com síndrome de Laron. Houve redução de 90% da AUC, de 76% da altura dos picos, de 30% do número total de picos e de 82% do número de picos maiores que 5,0 ng/ml. A liberação de HC estimulada pela clonidina sofreu redução de 88% (VACCARELLO *et al.*, 1993).

COTTERILL *et al.* avaliaram dois pacientes com síndrome de Laron em puberdade antes e durante a administração de RhIGF-I, 120µg/Kg, SC, duas vezes ao dia. Observaram que, após a administração de RhIGF-I às 19h, os níveis de IGF-I atingiam o pico máximo em 3 horas, declinavam nas próximas 9 horas e atingiam o valor mínimo antes da próxima injeção. Associado ao aumento dos níveis de IGF-I, havia supressão da secreção pulsátil de HC. Os níveis de HC permaneciam baixos até às 22h40min. e 1:00h nos pacientes 1 e 2, respectivamente. A seguir, a secreção de HC retornava com pulsos de menor amplitude que os observados antes do tratamento com RhIGF-I, sendo o pico

máximo 60% e 70% menor que os picos máximos antes da medicação nos pacientes 1 e 2, respectivamente. Ocorreu redução de 30% e 80% da concentração média de HC nos pacientes 1 e 2, respectivamente (COTTERILL *et al.*, 1993).

BERMANN *et al.* estudaram a secreção de HC em seis adultos normais antes e durante a infusão de 10-15µg/Kg/h de RhIGF-I. Houve supressão de 85% da concentração de HC durante a infusão de RhIGF-I, principalmente pela redução da amplitude espontânea dos pulsos (77%). O número de pulsos diminuiu 40% e a resposta do HC ao GHRH exógeno foi 82% menor com o uso de RhIGF-I (BERMANN *et al.*, 1994). A secreção hipofisária de HC é estimulada por descargas periódicas de GHRH e é tonicamente inibida pela SS. O IGF-I inibe a secreção de HC por *feedback* negativo. O mecanismo desta contra-regulação é complexo e ainda pouco conhecido em humanos.

Acredita-se que três possíveis mecanismos, isolados ou combinados, estejam envolvidos na supressão do HC causada pelo IGF-I: inibição hipofisária direta da secreção de HC, supressão da secreção hipotalâmica de GHRH e estimulação da liberação de SS.

Os pulsos periódicos de HC são dependentes principalmente da liberação pulsátil de GHRH. O decréscimo da frequência dos pulsos de HC durante a infusão de RhIGF-I pode ser atribuída à secreção atenuada de GHRH. Contudo, apenas o decréscimo de 40% da frequência dos pulsos observada por BERMANN *et al.* não é suficiente para explicar a redução de 85% da secreção total de HC. Os autores concluíram que o aumento de três vezes na concentração de IGF-I suprime quase completamente a secreção de HC, principalmente devido ao efeito supressivo do IGF-I sobre a amplitude dos pulsos de HC, acompanhado de redução da sensibilidade hipofisária ao GHRH. Esses achados, somados à redução da secreção de TSH basal e estimulada, sugerem que o alvo principal do *feedback* negativo do IGF-I em humanos sejam os neurônios hipotalâmicos produtores de SS. O declínio dos níveis de HC no período interpulso durante o uso de RhIGF-I reforça esta idéia. O decréscimo da frequência dos pulsos sugere principalmente aumento da secreção de SS induzida pelo RhIGF-I e, em parte, redução da secreção de GHRH (BERMANN *et al.*, 1994).

Os parâmetros de secreção de HC no presente estudo foram em média 30% menores durante o uso de RhIGF-I em relação ao período pré-medicação. Esta redução foi pequena comparada à encontrada em indivíduos normais e em pacientes com síndrome de Laron, apesar do aumento de 3 vezes dos níveis séricos de IGF-I. A supressão parcial da secreção de HC observada neste estudo sugere resistência hipotalâmica parcial à ação do IGF-I.

5.2 TSH

Os valores basais de TSH foram semelhantes antes e após o uso de RhIGF-I, sugerindo ausência de supressão do TSH basal pelo RHIGF-I.

Após o estímulo com TRH, o incremento do TSH (valor máximo subtraído do valor basal) foi 23% menor durante o uso de RhIGF-I. A média dos valores de TSH no teste do TRH não mostrou variação expressiva após a administração do RhIGF-I.

BERMANN *et al.* avaliaram a secreção de TSH basal e estimulada por TRH (50µg, EV *in bolus*) em indivíduos normais, antes e após a infusão contínua de RhIGF-I. Constataram redução de 50% nos valores basais de TSH e de 30% nos níveis após TRH durante o uso de RhIGF-I. Quando analisaram a AUC, observaram decréscimo de 44% (BERMANN *et al.*, 1994).

Em pacientes com síndrome de Laron também foi demonstrada a supressão do TSH com o uso de RhIGF-I (KLINGER *et al.*, 1990 citado por LARON *et al.*, 1991).

No presente estudo a dose de TRH utilizada foi 4 vezes maior que a empregada por BERMANN *et al.* Não houve redução dos níveis basais e a secreção estimulada de TSH foi menor durante o uso de RhIGF-I apenas aos 60 min. A AUC diminuiu apenas 12% com o uso do RhIGF-I.

Os dados mostram que a administração de RhIGF-I não causou supressão da secreção de TSH da mesma magnitude que a reportada na literatura. Os resultados sugerem a presença de resistência hipotalâmica parcial ao IGF-I hipotalâmico.

5.3 IGF-I, IGFBP-2 E IGFBP-3

Houve incremento de 2,6 vezes da concentração de IGF-I na fase B em relação à fase A. A concentração média de IGF-I na fase B (959,2µg/L) foi superior à encontrada em outros estudos e, portanto, seria suficiente para produzir os efeitos metabólicos e hormonais descritos (GULER *et al.*, 1990; WALKER *et al.*, 1991; VACCARELLO *et al.*, 1993; COTTERILL *et al.*, 1993; BERMANN *et al.*, 1994).

Os níveis basais de IGFBP-2 são normais para a idade. Permaneceram na faixa de normalidade, apesar do aumento de 22% após o RhIGF-I. O principal hormônio regulador da IGFBP-2 é o HC, e provavelmente este efeito não seja mediado pelo IGF-I. A administração de HC em bovinos causa redução dos valores séricos de IGFBP-2, e este efeito independe das alterações do IGF-I (VICINI, *et al.*, 1991). Em adultos normais, a infusão de RhIGF-I causa supressão da secreção de HC e aumento da IGFBP-2 (CLEMMONS, *et al.*, 1991). Foi relatado aumento de 45% da IGFBP-2 em pacientes com síndrome de Laron após RhIGF-I (VACCARELLO *et al.*, 1993). Não há relatos de dosagens de IGFBP-2 em normais durante o uso de RhIGF-I. A relação IGFBP-2/IGF-I estava normal antes e após o RhIGF-I, ou seja, menor que 3. Pacientes com hipopituitarismo têm valores maiores que 3 (SMITH *et al.*, 1993).

Os valores normais de IGFBP-2 no presente estudo podem ser considerados como evidência de secreção normal do HC antes e durante o uso de RhIGF-I. Este achado reforça a hipótese de presença de resistência hipotalâmica ao IGF-I.

A concentração de IGFBP-3 está elevada no período basal. Provavelmente isto ocorre porque a ALS do complexo circulante IGF-I/BP-3 é HC-dependente. Com a infusão de RhIGF-I em indivíduos normais, observa-se decréscimo dos níveis circulantes de ALS e do complexo IGF-I/BP3 (medido como IGFBP-3 por RIE). A ausência de redução dos valores de IGFBP-3 após a administração de RhIGF-I e a tendência à elevação podem ser consideradas evidências de resistência ao IGF-I. A presença de valores basais relativamente altos de IGFBP-3 sugere que a secreção de HC esteja acima do habitual.

5.4 Ca E N URINÁRIOS

O RhIGF-I produz uma variedade de efeitos HC-símile, incluindo redução do N sérico e urinário, aumento da excreção urinária de Ca (2,5 vezes), decréscimo da excreção urinária de fosfato e sódio, sem alterar a concentração sérica de fosfato e sódio (UNDERWOOD & BACKELJAUW, 1993).

VACCARELLO *et al.* obtiveram efeito hipercalcêmico (aumento de 57% da excreção de Ca) com o uso de RhIGF-I (40µg/Kg, SC a cada 12h) em adultos com síndrome de Laron (VACCARELLO *et al.*, 1993).

WALKER *et al.* observaram redução de 10% da excreção urinária de N e aumento de 2,4 vezes da excreção urinária de Ca ao utilizarem RhIGF-I em uma criança com síndrome de Laron (120µg/Kg, SC, duas vezes ao dia). Houve aumento de 22% do clearance de creatinina e de 1,5 vezes o volume urinário (WALKER *et al.*, 1992). O efeito atenuado sobre a retenção de N é concordante com os resultados obtidos em outros experimentos e sugere que o estímulo para a síntese protéica e a inibição da degradação protéica sejam dose-dependentes. A excreção urinária de Ca, clearance de creatinina e volume urinário parecem indicadores sensíveis da ação do RhIGF-I em pacientes com síndrome de Laron. O aumento da excreção urinária de Ca provavelmente se deve ao aumento do metabolismo ósseo e ao aumento da absorção de Ca estimulada pelo calcitriol.

A infusão de RhIGF-I em normais (20µg/Kg/h, 6 dias) não produziu efeito significativo sobre a excreção urinária de N. Por outro lado, o tratamento com RhGH resultou em balanço nitrogenado positivo no segundo dia de tratamento. Esta discrepância das respostas ao RhIGF-I e ao RhGH pode ser explicada por dois mecanismos: 1) a infusão de RhIGF-I suprime a secreção de HC e diminui os níveis de IGF-II. Pode-se arguir que o HC e o IGF-II são necessários para a ação anabólica plena do IGF-I; 2) O HC provavelmente tem efeitos anabólicos diretos sobre o músculo não mediados pelo IGF-I (GULER *et al.*, 1989).

No presente caso, o RhIGF-I causou redução de 20% da excreção de N. Baseados nos dados de GULER *et al.*, a redução observada pode ser considerada pequena em virtude da combinação de níveis elevados de IGF-I e secreção mantida de HC.

A excreção de Ca aumentou 60% nos dois últimos dias com a dose máxima de RhIGF-I. Esta resposta é pequena quando comparada à observada nos pacientes com síndrome de Laron.

Os resultados da excreção de Ca e N sugerem que a paciente não respondeu apropriadamente ao RhIGF-I.

Houve redução de 28% da média do volume urinário durante o uso de RhIGF-I. Este achado é diferente do observado em indivíduos normais e paciente com síndrome de Laron (GULER *et al.*, 1989; WALKER *et al.*, 1991).

5.5 GLICOSE

Durante a administração de RhIGF-I houve dois episódios de hipoglicemia (42mg/dl), assintomáticos, em vigência de 60µg/Kg de 12/12h. Ocorreram às 24h e 3h do mesmo dia 11. Às 8h da manhã a glicemia estava normal. No período de uso do RhIGF-I a ingesta calórica variou de 1210 a 1485Kcal/dia (1322Kcal/dia em média), excluindo-se o dia 11, em que a ingesta calórica foi de 869Kcal/dia. A hipoglicemia pode ter sido causada pela ingesta calórica insuficiente, pois não ocorreram outros episódios, mesmo com o uso de doses maiores de RhIGF-I.

6 CONCLUSÕES

- A supressão parcial da secreção de HC durante a administração de RhIGF-I sugere a presença de resistência hipotalâmica parcial ao IGF-I.
- Os valores de TSH no teste do TRH na vigência do RhIGF-I reforçam a hipótese da presença de resistência hipotalâmica parcial ao IGF-I.
- Os valores elevados de IGF-I e IGFBP-3 e os valores normais de IGFBP-2, antes e durante a administração de RhIGF-I, evidenciam a presença de resistência hipotalâmica ao IGF-I.
- A excreção urinária de Ca e N durante o uso de RhIGF-I é compatível com uma resposta parcial de outros tecidos ao IGF-I.

7 COMENTÁRIOS E PROJEÇÕES

- O retardo de crescimento pré e pós-natal, o retardo mental e a resposta terapêutica a doses elevadas de RhGH, no presente caso, são sugestivos de resistência ao IGF-I.
- A resposta clínica ao tratamento com oxandrolona, combinada ao RhGH ou isoladamente, sugere que este esteróide atuaria potencializando a ação do IGF-I. Esta hipótese merece ser testada em estudos *in vitro*.
- O presente estudo mostrou evidência de resistência hipotalâmica e periférica ao IGF-I. O ideal para avaliar a relação resistência ao IGF-I e retardo de crescimento neste paciente seria a realização de estudos da ação do RhIGF-I em cultura de condrócitos, uma vez que se demonstrou que fibroblastos em cultura respondem normalmente ao RhIGF-I.

**ANEXO 1 - APROVAÇÃO DO PROTOCOLO PELA COMISSÃO
DE ÉTICA DO HOSPITAL DE CLÍNICAS**

Curitiba, 24 de abril de 1997.

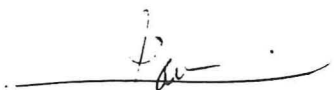
Ilmo(a) Sr.(a).
Dra. Juliene Angela Ramires
Nesta


Prezado (a) Senhor (a):

Informo que o projeto **"Influência do Insulin-Like Growth Factor 1 - Biossintético Humano sobre o ritmo circadiano do Hormônio de Crescimento e Secreção Estimulada do TSH, Insulina e Peptídeo-C na Síndrome de Resistência ao IGF-1"** foi aprovado em reunião da Comissão de Ética Médica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná no dia 05/04/95.

Sendo o que se apresenta para o momento, subscrevo-me,

Atenciosamente


Prof. Renato Tambara Filho
Presidente da Comissão de
Ética Médica da UFPR


Dr. Nazy Ramos Filho
Secretário da Comissão de
Ética Médica da UFPR

ANEXO 2 - CONSENTIMENTO POR ESCRITO DOS PAIS

TERMO DE CONSENTIMENTO

Autorizo que minha filha, Joanna Talita Lessa, receba IGF-1 biossintético humano via subcutânea durante internamento no Hospital de Clínicas. Declaro ter sido informada dos efeitos esperados do medicamento e da necessidade do controle alimentar, bem como da realização de coleta de sangue venoso para exames bioquímicos, hormonais e genéticos.

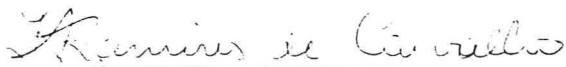
Recebi os esclarecimentos sobre os objetivos e detalhes do tratamento através do Dr Luiz de Lacerda Filho e da Dra Julienne Angela Ramires de Carvalho, que serão os médicos responsáveis.

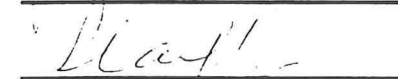
Entendo que minha filha não é obrigada a receber a medicação e que posso desistir de continuar a qualquer momento, sem que isso prejudique seu atendimento médico.

Meu nome e de minha família não serão utilizados nos documentos pertencentes a este projeto e a confidencialidade dos registros médicos estará garantida.


Concordo que minha filha participe do projeto e me disponho a cooperar com os médicos na sua realização.

Curitiba, 20 de fevereiro de 1996





Médicos



Mãe



Testemunha

**ANEXO 3 - MODELO DE FICHA DE CONTROLE
DIETÉTICO EMPREGADA**

Ficha de ingestão alimentar

Data / /

Desjejum (café da manhã)

Alimento peso emb. peso c/emb. peso s/emb sobra do alimento ingesta real

COLAÇÃO

Alimento peso emb. peso c/emb. peso s/emb sobra do alimento ingesta real

Almoço

Alimento peso emb. peso c/emb. peso s/emb sobra do alimento ingesta real

Lanche da tarde

Alimento peso emb. peso c/emb. peso s/emb sobra do alimento ingesta real

Jantar

Alimento peso emb. peso c/emb. peso s/emb sobra do alimento ingesta real

Ceia noturna

Alimento peso emb. peso c/emb. peso s/emb sobra do alimento ingesta real

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 AGUIRRE, J. G. Insulin-like growth factor I - An important intrauterine growth factor. **The New England Journal Medicine**, v. 31, n. 18, 1996.
- 2 ALBERTSSON-WIKLAND, K.; HALL, K. Growth hormone treatment in short children : relationship between growth and serum insulin-like growth factor I and II levels. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 65, p. 671-678, 1987.
- 3 ALBERTSSON-WIKLAND, K.; ROSBERG, S.; LIBRE, E. Growth hormone secretory rates in children as estimated by deconvolution analysis of 24-h plasma concentration profiles. **Am. J. Physiol.**, v. 257, n. 20, p. E809-E814, 1989.
- 4 BANG, P.; HALL, K. Insulin-like growth factors as endocrine and paracrine hormones. In: **The Insulin-Like Growth Factors Structural and Biological Function**. SCHOFIELD, P. N. New York : Oxford University Press, 1992, p. 151-177.
- 5 BARINAGA, M.; YAMONOTO G.; RIVIER, C. *et al.* Transcriptional regulation of growth hormone gene expression by growth hormone-releasing factor. **Nature**, v. 306, n. 84, 1983.
- 6 BAXTER, R. C. Circulating levels and molecular distribution of the acid-labile (alpha) subunit of the high molecular weight insulin-like growth factor binding protein complex. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 70, p. 1347-1353, 1990.
- 7 BAXTER, R. C. The somatomedins : insulin-like growth factors. **Adv. Clin. Chem.**, v. 25, p. 49-235, 1986.
- 8 BAXTER, R. C.; MARTIN, J. L. Binding proteins for the insulin-like growth factors : structure, regulation and function. **Prog. Growth Factor Res.**, v. 1, p. 49-68, 1989.
- 9 BAXTER, R. C.; MARTIN, J. L. Binding proteins for the insulin-like growth factors : structure, regulation and function. **Prog. Growth Factor Res.**, v. 1, p. 49-68, 1989.
- 10 BAXTER, R. Circulating binding proteins for the insulin-like growth factors. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 4, p. 91-6, 1993.
- 11 BECK, K. D.; POWELL-BRAXTON, L.; WIDMER, H. R. *et al.* Igf1 gene disruption results in reduced brain size, SNC hypomyelination, and loss of hippocampal granule and striatal parvalbumin-containing neurons. **Neuron.**, p. 717-30, 1995.
- 12 BERMAN, M.; JAFFE, C. A.; TSAI, W. *et al.* Negative Feedback Regulation of Pulsatile Growth Hormone Secretion by Insulin-like Growth Factor I. **J. Clin. Invest.**, v. 94, p. 138-145, 1994.

- 13 BLUM, F. W.; ALBERTSON-WIKLAND, K.; ROSBERG, S.; RANKE, M. B. Serum Levels of Insulin-like Growth Factor I (IGF-I) and IGF Binding Protein 3 Reflect Spontaneous Growth Hormone Secretion. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 76, n. 6, p. 1610-1616, 1993.
- 14 BLUNDELL, T. L.; BERDARKAR, L. S.; HUMBEL, R. E. Tertiary structures, receptor binding and antigenicity of insulin-like growth factors. **Federation Proc.**, v. 42, p. 2592-2597, 1983.
- 15 BORGHGRAEF, M.; FRYNS, J. P.; VAN DEN BERGHE, H. **Journal of Mental Deficiency Research**, v. 32, p. 337-347, 1988.
- 16 BOURNER, M. J.; BUSBY, W. H.; SEIGLE, N. R. *et al.* Cloning and sequence determination of bovine IGFBP-2 : comparison of its structural and functional properties with IGFBP-1. **J. Cell Biochem.**, v. 48, p. 215-226, 1992.
- 17 BUTLER, M. G.; FOGO, A. B.; FUCHS, D. A. *et al.* Brief Clinical Report and Review : Two Patients With Ring Chromosome 15 Syndrome. **Am. J. Med. Genet.**, v. 29, p. 149-154, 1988.
- 18 CAMACHO-HUBNER, C.; BUSBY, W. H.; MCCUSKER, R. H. *et al.* Identification of the forms of insulin-like growth factor binding proteins produced by human fibroblasts and the mechanisms that regulate their secretion. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 11949-11956, 1992.
- 19 CASCIERI, M. A. SAPERSTEIN, R.; HAYES, N. S. *et al.* Serum half-life and biological activity of mutants of human insulin-like growth factor I which do not bind to serum binding proteins. **Endocrinology**, v. 123, p. 373-381, 1988.
- 20 CLEMMONS, D. R. Role of Insulin-like Growth Factor Binding Proteins in Modulating Insulin-like Growth Factor Action. In: **Growth Hormone and Somatomedins during Lifespan**. MÜLLER, E. E.; COCCHI, D.; LOCATELLI, V. Berlin : Springer-Verlag, 1993, p. 109-116.
- 21 CLEMMONS, D. R.; BUSBY, W. H.; SNYDER, D. K. Variables controlling the secretios of insulin-like growth factor binding protein-2 in normal human subjects. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 73, p. 727-733, 1991.
- 22 CLEMMONS, D. R.; BUSBY, W. H.; SNYDER, D. K. Variables controlling the secretion of insulin-like growth factor binding protein-2 in normal human subjects. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 73, p. 727-733, 1991.
- 23 CLEMMONS, D. R.; SMITH-BANKS, A.; UNDERWOOD, L. E. Reversal of diet-induced catabolism by infusion of recombinant insulin-like growth factor-I (IGF-I) in humans. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 75, p. 234-238, 1992.
- 24 CLEMMONS, D. R.; THISSEN, J. R.; MAES, M. *et al.* Insulin-like growth factor-I (IGF-I) infusion into hypophisectomized or protein deprived rats induces specific IGF binding proteins in serum. **Endocrinology**, v. 125, p. 2967-1972, 1989.
- 25 COHIC, W. S.; CLEMMONS, D. R. Regulation of insulin-like growth factor binding protein synthesis and secretion in a bovine epithelial cell line. **Endocrinology**, v. 129, p. 1347-1354, 1991.
- 26 COHIC, W. S.; CLEMMONS, D. R. The insulin-like growth factors. **Annu Ver Physiol.**, v. 55, p. 131-53, 1993.

- 27 COPELAND, K. C.; UNDERWOOD, L. E.; VAN WYK, J. J. Induction of immunoreactive somatomedin-C in human serum by growth hormone : dose response relationships and effect on chromatographic profiles. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 50, p. 690-697, 1980.
- 28 D'ERCOLE, A. J.; STILES, A. D.; UNDERWOOD, L. E. Tissue concentrations of somatomedin-C : further evidence for multiple sites of synthesis and paracrine or autocrine mechanisms of action. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 81, p. 935-939, 1984.
- 29 DAUGHADAY, W. H. A personal history of the origin of the somatomedin hypothesis and recents challenges to its validity. The Somatomedin Hypothesis. **Perspectives in Biology and Medicine**, v. 32, p. 194-211, 1989.
- 30 DAUGHADAY, W. H.; HALL, K.; RABEN, M. S. *et al.* Somatomedin : proposed designation for sulphation factor. **Nature Lond.**, v. 235, p. 107, 1972.
- 31 DAUGHADAY, W. H.; HALL, K.; SALMON, W. D. *et al.* On the nomenclature of the somatomedins and insulin-like growth factors. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 65, p. 1075-1076, 1987.
- 32 DAUGHADAY, W. H.; MARIZ, I. K.; BLETHEN, S. L. Inhibition of access of bound somatomedin to membrane receptor and immunological sites : a comparison of radioreceptor and radioimmunoassay of somatomedin in native and acid-ethanol extracted serum. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 51, p. 781-188, 1980.
- 33 DAUGHADAY, W. H.; MARIZ, I. K.; BLETHEN, S. L. Inhibition of access of basic somatomedin in saline and acid alcohol extracted serum. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 51, p. 781-788, 1980.
- 34 DAUGHADAY, W. H.; PHILLIPS, L. S.; MÜELLER, M. C. The effects of insulin and growth hormone on the release of somatomedin by the isolated rat liver. **Endocrinology**, v. 98, p. 1214-1219, 1976.
- 35 DAUGHADAY, W. H.; TRIVERDI, B. Absence of serum growth hormone binding protein in patients with growth hormone receptor deficiency (Laron dwarfism). **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 84, p. 4636-4640, 1987.
- 36 DAVENPORT, M. L.; SVOBODA, M. E.; KOERBER, K. L. *et al.* Plasma concentrations of insulin-like growth factor II (IGF-II) are not changed by short-term fasting and refeeding. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 67, p. 1231-1236, 1988.
- 37 DE JONG, G.; ROSSOUW, R. A.; RETIEF, A. E. Ring chromosome 15 in a patient with features of Frys syndrome. **J. Med. Genet.**, v. 26, p. 469-70, 1989.
- 38 ENBERG, G.; CARLQUIST, M.; JÖRNVALL, H.; HALL, K. The characterization of somatomedin A, isolated by microcomputer-controlled chromatography, reveals an apparent identity to insulin-like growth factor 1. **Eur. J. Biochem.**, v. 143, p. 117-124, 1984.
- 39 ESCH, F. S.; BOHLEN, P.; LING, N. C. *et al.* Primary structure of three human pancreas peptides with growth hormone releasing activity. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 258, n. 1806, 1983.

- 40 FAGIN, J. A.; MELMED, S. Relative increase in insulin-like growth factor I messenger ribonucleic acid levels in compensatory renal hypertrophy. **Endocrinology**, v. 120, p. 718-724, 1987.
- 41 FELTZ, S. M.; SWANSON, S. M.; WEMMIE, J. Á. *et al.* Functional properties of isolated heterodimeric human placenta insulin-like growth factor I complex. **Biochemistry**, v. 27, p. 3234, 1988.
- 42 FRANCKE, U.; DARRAS, B. T.; FOELLMER, B. E. Loss of IGF-I receptor gene in patients with ring chromosome 15 is related to Russel-Silver like phenotype. **Proceedings of the 9th Annual David W. Smith Workshop on Malformations and Morphogenesis**. Oakland CA, August, 1988.
- 43 FRYNS, J. P.; BORGHGRAEF, M.; KLECZKOWSKA, A. *et al.* Ring chromosome 15 : follow up data and psychological development. **Genetic Counseling**, v. 38, n. 2, p. 167-172, 1990.
- 44 FRYNS, J. P.; KLECZKOWSKA, A.; BUTTIENS, M. *et al.* Ring chromosome 15 syndrome. Further delineation of the adult phenotype. **Annales de Génétique**, v. 29, p. 45-8, 1986.
- 45 FUJIMAKI, W.; BABA, K.; TATARA, K. *et al.* Ring chromosome 15 in a mother and her children. **Hum. Genet.**, v. 76, p. 302, 1987.
- 46 FURLANETTO, R. W. Pitfalls in the somatomedin-c radioimmunoassay. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 54, p. 1084-1086, 1982.
- 47 FURLANETTO, R. W.; DICARLO, J. N.; WISEHART, C. *et al.* The type II insulin-like growth factor receptor does not mediate deoxyribonucleic acid synthesis in human fibroblasts. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 64, p. 1142, 1987.
- 48 GENENTECH COLLABORATIVE STUDY GROUP. Idiopathic short stature : results of one year controlled study of human growth hormone treatment. **J. Pediatr.**, v. 115, p. 713-719, 1989.
- 49 GIUDICE, L. C.; DE ZEGHER, F.; GARGOSKY, S. E. *et al.* Insulin-like growth factors and their binding proteins in the term and preterm human fetus and neonate with normal and extremes of intrauterine growth. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Bethesda, v. 80, p. 1548-55, 1995.
- 50 GULER, H. P.; SCHMID, C.; ZAPF, J. *et al.* Effects of recombinant insulin-like growth factor I on insulin secretion and renal function in normal human subjects. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 86, p. 2868-72, 1989(a).
- 51 GULER, H. P.; ZAPF, J.; FROESH, E. R. Short-term metabolic effects of recombinant human insulin-like growth factor in healthy adults. **The New England Journal of Medicine**, v. 317, n. 3, p. 137-140, 1987.
- 52 HALL, K.; BOZOVIC, M. Stimulation of ³⁵S incorporation into embryonic chick cartilage by extract from rat muscle. **Horm. Metab. Res.**, v. 1, p. 235-240, 1969.
- 53 HALL, K.; BRANDT, J.; EMBERG, G. *et al.* Immuno-reactive somatomedin A in human serum. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 48, p. 271-278, 1979.

- 54 HALL, K.; EMBERG, G.; RITZÉN, M. *et al.* Somatomedin A levels in serum from healthy children and from children with growth hormone deficiency and delayed puberty. **Acta Endocrinol.**, v. 94, p. 155-165, 1980.
- 55 HALL, K.; JOHANSSON, B. L.; POVOA, G. *et al.* Serum levels of insulin-like growth factor (IGF) I, II, and IGF binding protein in diabetic adolescents treated with continuous subcutaneous insulin infusion. **Journal of Internal Medicine**, v. 225, p. 273-278, 1989.
- 56 HALL, K.; SARA, V. R. Somatomedin levels in childhood and adolescence and in adult life. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 13, p. 91-112, 1984.
- 57 HAN, V. K.; LUND, P. K.; LEE, D. C.; D'ERCOLE, A. J. Expression of somatomedin/insulin-like growth factor messenger ribonucleic acids in the human fetus : identification, characterization, and tissue distribution. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Bethesda, v. 66, p. 422-9, 1988.
- 58 HARDOUIN, S.; HOSSENLOPP, P.; SEGOVIA, B. *et al.* Heterogeneity of insulin-like growth factor binding proteins and relationships between structure and affinity. Circulating forms in man. **Eur. J. Biochem.**, v. 170, p. 121-132, 1987.
- 59 HOLL, R. W.; THORNER, M. O.; LEONG, D. A. Intracellular calcium concentration and growth hormone secretion in individual somatotropes : effects of growth hormone-releasing factor and somatostatin. **Endocrinology**, v. 122, n. 2927, 1988.
- 60 HORIGOME, Y.; KONDO, I.; KUWAJIMA, K. *et al.* Familial occurrence of ring chromosome 15. **Clin. Genet.**, v. 41, p. 178-80, 1992.
- 61 ISAKSSON, O. G. P.; EDEN, S.; JANSON, J. O. Mode of action of pituitary growth hormone on target cells. **Annual Review of Physiology**, v. 47, p. 483-99, 1985.
- 62 JACOBSEN, P. A ring chromosome in the 13-15 group associated with microcephalic dwarfism, mental retardation and emotional immaturity. **Hereditas**, v. 55, p. 188-191, 1966.
- 63 JANSEN, M.; VAN SCHAIK, F. M. A.; RICKER, A. T. *et al.* Sequence of cDNA encoding human insulin-like growth factor I precursor. **Nature Lond.**, v. 306, p. 609-611, 1983.
- 64 JONES, J. I.; CLEMMONS, D. R. Insulin-like growth factors and their binding proteins : biological actions. **Endocrine Reviews**, v. 16, n. 1, p. 3-34, 1995.
- 65 KISS, P.; OSZTOVICS, M.; Ring chromosome 15. **Acta Paediatrica Academiae Scientiarum Hungaricae**, v. 23, p. 409-15, 1982.
- 66 KITATANI, M.; TAKAHASHI, H.; OZAKI, M. *et al.* A case of ring chromosome 15 accompanied by almost normal intelligence. **Hum. Genet.**, v. 85, p. 138-139, 1990.
- 67 KOSTOLÁNYI, G. Decreased cell viability of fibroblasts from two patients with a ring chromosome : An in vitro reflection of growth failure? **Am. J. Med. Genet.**, v. 28, p. 181-184, 1987.

- 68 KOSTOLÁNYI, G.; PAP, M. Severe growth failure associated with atrophic intestinal mucosa and ring chromosome 15. *Acta Paediatr. Scand.*, v. 75, p. 326-331, 1986.
- 69 LANES, R.; RECKER, B.; FORT, P. *et al.* Impaired somatomedin generation test in children with insulin dependent diabetes mellitus. *Diabetes*, v. 34, p. 156-60, 1985.
- 70 LIU, J. P.; BAKER, J.; PERKINS, A. S. *et al.* A mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-I) and type I IGF receptor (Igflr). *Cell*, v. 75, p. 59-72, 1993.
- 71 LOWE JR, W. L.; ROBERTS JR, C. T.; LASKY, S. R.; LEROITH, D. Differential expression of alternative 5' untranslated regions in mRNAs encoding rat insulin-like growth factor I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 84, p. 8946-8950, 1987.
- 72 MCCUSKER, R. H.; CLEMMONS, D. R. The insulin-like growth factor binding proteins : structure and biological functions. In: SCHOFIELD, P. N. **The Insulin-like Growth Factors : Structure and Biological Functions.** New York : Oxford University Press, p. 110-50, 1992.
- 73 MCCUSKER, R.; BUSBY, W. H.; DEHOFF, M. H. *et al.* Insulin-like growth factor (IGF) binding to cell monolayers is directly modulated by the addition of IGF-binding proteins. *Endocrinology*, v. 129, p. 939-49, 1991.
- 74 MEINCKE, P.; KOSKE-WESTPHALT, T. Ring chromosome 15 in a male adult with radial defects. Evaluation of the phenotype. *Clin. Genet.*, v. 18, p. 428-433, 1980.
- 75 MERIMEE, T. J.; ZAPF, J.; FROESH, E. R. Insulin-like growth factors in the fed and fasted states. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v. 55, p. 999-1002, 1982.
- 76 MERRIAN, G. R.; WACHTER, K. W. Algorithms for the study of episodic hormone secretion. *Am. J. Physiol.*, v. 243, n. 5, p. E310-E318, 1982.
- 77 MINUTO, F.; BARRECA, A.; GIORDANO, G. Autocrine and Paracrine Effects of Insulin-like Growth Factors and Their Binding Proteins. In: **Growth Hormone and Somatomedins During Lifespan.** MÜLLER, E. E; COCCHI, D.; LOCATELLI, V. Berlin : Springer-Verlag, 1993, p. 117-128.
- 78 MOREAU, N.; TEYSSIER, M. Ring chromosome 15 : report of a case in na infertile man. *Clin. Genet.*, v. 21, p. 272-9, 1982.
- 79 MOSES, A. C.; NISSLEY, S. P.; SHORT, P. A. *et al.* Increased levels of multiplication-stimulating activity and insulin-like growth factor, in fetal rat serum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 77, p. 3649-3653, 1980.
- 80 MURPHY, L. J.; TACHIBANA, K.; FRIESEN, H. G. Stimulation of hepatic insulin-like growth factor-I gene expression by ovine prolactin : evidence for intrinsic somatogenic activity in the rat. *Endocrinology*, v. 122, p. 2027-2033, 1988.
- 81 MYERS, M. G. JR; SUN, X. J., CHEATHAM B. *et al.* IRS-1 is a common element in insulin and insulin-like growth factor-I signaling to the phosphatidylinositol 3'kinase. *Endocrinology*, v. 132, p. 1421-30, 1993.

- 82 NIELSEN, F. C.; WANG, E.; GAMMELTOF, S. Receptor binding, endocytosis, and mitogenesis insulin-like growth factor I and II in fetal rat brain neurons. **J. Neurochem.**, v. 56, 1991.
- 83 NUUTINEN, M.; KOUVALAINEN, M. K. Good growth response to growth hormone treatment in the ring chromosome 15 syndrome. **J. Med. Genet.**, v. 32, p. 486-487, 1995.
- 84 PHILIPPS, A. F.; PERSSON, B.; HALL, K. *et al.* The effects of biosynthetic insulin-like growth factor-I supplementation on somatic growth, maturation, and erythropoiesis on the neonatal rat. **Pediatr. Res.**, v. 23, p. 298-305, 1988.
- 85 PHILLIPS, L. S.; HARP, J. B.; GOLDSTEIN, S. *et al.* Regulation and action of the insulin-like growth factors at the cellular level. **Proc. Nutr. Soc.**, v. 49, p. 451-8, 1990.
- 86 PÓVOA, G.; HALL, K.; COLLINS, V. P. Studies on somatomedin binding protein. In: **Proc. Adv. in Growth Hormone and Growth Factor Research.** MÜELLER, E. E.; COCCHI, D.; LOCATELLI V. New York : Springer-Verlag, 1989, p. 121-132.
- 87 POWELL-BRAXTON, L.; HOLLINGSHEAD, P.; WARBURTON, C. *et al.* IGF-I is required for normal embryonic growth in mice. **Genes Dev.**, v. 7, p. 2609-17, 1993.
- 88 REICHLIN, SEYMOUR. Neuroendocrinology. In: WILSON, J. D. & FOSTER, D. W. **Williams Textbook of Endocrinology.** 8th ed. Philadelphia : HB Saunders, 1992. p. 135-219.
- 89 RINDERKNECHT, E.; HUMBEL, R. E. The amino acid sequence of insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. **J. Biol. Chem.**, v. 253, p. 2769-2776, 1978(a).
- 90 RINDERKNECHT, E.; HUMBEL, R. E. Polypeptides with nonsuppressible insulin-like and cell growth promoting activity in human serum : isolation, chemical characterization and some biological properties. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 73, p. 2365-2369, 1986.
- 91 RINDERKNECHT, E.; HUMBEL, R. E. Primary structure of human insulin-like growth factor II. **FEBS Lett.**, v. 89, p. 283-286, 1978(b).
- 92 ROBACK, E. W.; BARAKAT, A. G.; DEV, V. G. *et al.* An infant with deletion of the distal long arm of chromosome 15 (q26.1→qter) and loss of insulin-like growth factor I receptor gene. **American Journal of Medical Genetics**, v. 38, p. 7479, 1991.
- 93 ROSENFELD, R. G. Disorders of Growth Hormone and Insulin-Like Growth factor Secretion and Action. In: **Pediatric Endocrinology.** SPERLING, M. A. Philadelphia : W. B. Saunders Company, 1996, p. 117-169.
- 94 ROSENFELD, R. G.; CONOVER, C. A.; HODGES, D. *et al.* Heterogenicity of insulin-like growth factor-I affinity for the insulin-like growth factor II receptor : comparison of natural, synthetic and recombinant DNA-derived insulin-like growth factor-I. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 143, p. 195, 1987.

- 95 SALMON, W. D.; DAUGHADAY, W. H. A hormonally controlled serum factor which stimulates sulphate incorporation by cartilage in vitro. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 49, p. 825-836, 1957.
- 96 SARA, V. R.; HALL, K. Insulin-Like Growth Factors and Their Binding Proteins. **Physiological Reviews**, v. 70, n. 3, p. 591-614, 1990.
- 97 SARA, V. R.; HALL, K.; LINS, P. E.; FRYKLUND, L. Serum levels of immunoreactive somatomedin A in the rat : some developmental aspects. **Endocrinology**, v. 107, p. 622-625, 1980.
- 98 SAVAGE, M. O.; BLUM, W. F.; RANKE, M. B. *et al.* Clinical features and endocrine status in patients with growth hormone insensitivity (Laron syndrome). **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Bethesda, v. 77, p. 1465-71, 1993.
- 99 SCHANDER, J. C.; HAURI, C.; ZAPF, J. *et al.* Synthesis and secretion of insulin-like growth factor and its binding protein by perfused rat liver : dependence on growth hormone status. **Endocrinology**, v. 113, p. 297-305, 1983.
- 100 SCHLECHTER, N. L.; RUSSEL, S. M.; SPENCER, E. M. *et al.* Evidence to suggest that the direct growth promoting effects of growth hormone on cartilage *in vivo* are mediated by local production of somatomedin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 83, p. 2932-4, 1986.
- 101 SHIMASAKI, S.; SHIMONAKA, M.; LING, N. Identification of five insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) from adult rat serum and molecular cloning of a novel IGFBP in rat and human. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 10646-10653, 1991.
- 102 SIEBLER, T.; LOPACZYNSKI, W.; TERRY, C. L. *et al.* Insulin-like growth factor I receptor expression and function in fibroblasts from two patients with deletion of the distal long arm of chromosome 15. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Bethesda, v. 80, n. 12, p. 3447-57, 1995.
- 103 SMITH, W. L.; NAM, T. J.; UNDERWOOD, L. E. *et al.* Use of insulin-like growth factor-binding protein-2 (IGFBP-2), IGFBP-3, and IGF I for assessing growth hormone status in short children. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 77, p. 1294-1299, 1993.
- 104 SOOS, M. A.; SIDDLE, K. Immunological relationships between receptors for insulin and insulin-like growth factor I. **Biochemistry J.**, v. 263, p. 553, 1989.
- 105 TAMURA, T.; TOHMA, T.; OHTA, T. *et al.* Ring chromosome 15 involving deletion of the insulin-like growth factor 1 in a patient with features of Silver-Russell syndrome. **Clinical Dysmorphology**, v. 2, p. 106-113, 1993.
- 106 TAMURA, T.; TOHMA, T.; OHTA, T. Ring chromosome 15 involving deletion of the insulin-like growth factor 1 receptor gene in a patient with features of Silver-Russell syndrome. **Clin. Dysmorphol.**, v. 2, p. 106-113, 1993.
- 107 THOMPSON, M. W. Base Cromossômica da Hereditariedade. In: **Genética Médica**. _____. 5. ed. São Paulo : Guanabara Koogan, 1993, p. 8-21.
- 108 THOMPSON, M. W. Citogenética Clínica : Princípios Gerais e Anormalidades Autossômicas. In: **Genética Médica**. _____. 5. ed. São Paulo : Guanabara Koogan 1993, p. 138-156.

- 109 TREADWAY, J. L.; MORRISON, B. D.; GOLDFINE, I. D. *et al.* Assembly of insulin/insulin-like growth factor-1 hybrid receptors in vitro. **J. Biol. Chem.**, v. 264, p. 21450, 1989.
- 110 ULLRICH, A.; GRAY, A.; TAM, A. W. *et al.* Insulin-like growth factor I receptor primary structure : comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. **EMBO J.**, v. 5, p. 2503-2512, 1986.
- 111 UNDERWOOD, L. E.; VAN WYK, J. J. Normal and aberrant growth. In: WILSON, J.; FOSTER, D. **Williams Textbook of Endocrinology**, 8. ed. Philadelphia : Saunders, 1992. p. 1079-1138.
- 112 VACCARELLO, M. A.; DIAMOND, F. B.; AGUIRRE, J. G. *et al.* Hormonal and metabolic effects and pharmacokinetics of recombinant insulin-like growth factor-I in growth hormone receptor deficiency/Laron syndrome. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Bethesda, v. 77, n. 1, p. 273-280, 1993.
- 113 VAN DEN BRANDE, J. L. Structure of the human insulin-like growth factors : relationship to function. In: **The Insulin-like Growth Factors Structural and Biological Functions**. PAUL, N. SCHOFIELD. New York : Oxford University Press, 1992, p. 12-44.
- 114 VAN DEN BRANDE, J. L.; HOOGERBRUGGE, C. M.; BEYREUTHER, K. *et al.* Isolation and partial characterization of IGF-like peptides from cohn fraction IV of human plasma. **Acta Endocrinol.**, v. 122, p. 283-95, 1990.
- 115 VICINI, J. L.; BUONOMO, F. C.; VEENHUIZEIN, J. J. *et al.* Effects of nutritional balance and stage of lactation in dairy cows on insulin, insulin-like growth factors I and II and insulin-like growth factor binding protein-2 responses to somatotropin administration. **J. Nutr.**, v. 121, p. 1656-1664, 1991.
- 116 WALKER, J. L.; MALINOWSKA, M. G.; ROMER, T. E. *et al.* Effects of the infusion of insulin-like growth factor I in a child with growth hormone insensitivity syndrome (Laron dwarfism). **The New England Journal of Medicine**, v. 324, n. 21, p. 1483-1488, 1991.
- 117 WARD, A.; ELLISS, C. J.. The insulin-like growth factor genes. In: **The Insulin-Like Growth Factors Structure and Biological Function**. SCHOFIELD, P. N. New York : Oxford University Press, 1992, p. 45-79.
- 118 WILSON, G. N.; SAUDER, S. E.; BUSH, M. *et al.* Phenotypic delineation of ring chromosome 15 and Russell-Silver syndrome. **J. Med. Genet.**, v. 22, p. 233-236, 1985.
- 119 WILTON, P.; SIETNIEKS, A.; GUNNARSSON, R. *et al.* Pharmacokinetic Profile of Recombinant Human Insulin-Like Growth Factor I Given Subcutaneously in Normal Subjects. **Acta Padiatr. Scand. Suppl.**, v. 377, p. 111-114, 1991.
- 120 WOODS, K.A.; HÜBNER, C.C.; SAVAGE, M.O.; CLARK, A. J.L. Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor I gene. **The New England Journal of Medicine**, v. 335, n. 18, p. 1363-1367, 1996.

- 121 WOODS, K.A.; WEBER, A.; CLARK, A.J.L. The molecular pathology of pituitary hormone deficiency and resistance. In: THAKKER, R. **Genetic and molecular biological aspects of endocrine disease**. London : Ballière Tindall, p. 453-87, 1995.
- 122 ZENOBI, P.D.; GRAF, S.; URSPRUNG, H. *et al.* Effects of insulin-like growth factor-I on glucose tolerance, insulin levels, and insulin secretion. **J. Clin. Invest.**, v. 89, p. 1908-1913, 1992.